

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Veronika Kacerovská

VÝVOJ HPLC-FLD METODY PRO STANOVENÍ ŽLUČOVÝCH KYSELIN VE ŽLUČI MYŠÍ

The Development of HPLC-FLD Method for the Determination of the
Bile Acids in the Bile of Mice

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Karel Nesměrák, Ph.D.

Praha 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze, 17. května 2017

Poděkování

Ráda bych poděkovala mému vždy vlídnému školiteli RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D. za odbornou pomoc a cenné rady, jež mi poskytoval během vypracovávání této diplomové práce. Za poskytnutí vzorků myší žluči patří můj dík také paní Markétě Jirouškové, M.Sc., Ph.D. Rovněž děkuji svým rodičům, sestře, příteli a blízkým přátelům za veškerou podporu a pomoc, které se mi od nich dostávalo.

Abstrakt

Cílem diplomové práce byl vývoj a optimalizace HPLC metody s fluorescenční detekcí pro stanovení vybraných žlučových kyselin v myší žluči. Bylo vybráno osm žlučových kyselin (cholová kyselina, glykocholová kyselina, deoxycholová kyselina, glykodeoxycholová kyselina, chenodeoxycholová kyselina, glykochenodeoxycholová kyselina, α -muricholová kyselina a λ -muricholová kyselina) pro které byla na základě literatury navržena a následně optimalizována HPLC metoda s fluorescenční detekcí pro jejich kvantifikaci v uvedeném biologickém materiálu. Vhodným derivatizačním činidlem pro označení žlučových kyselin je 1,2-benzo-3,4-dihydro-karbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonát. Pro všechny žlučové kyseliny byly změřeny kalibrační závislosti a stanoveny limity kvantifikace a limity detekce (v rozsahu 0,88–1,78 $\mu\text{mol dm}^{-3}$). V biologickém vzorku se vypracovanou metodou podařilo identifikovat a následně stanovit pět žlučových kyselin (cholová kyselina, glykocholová kyselina, glykodeoxycholová kyselina, glykochenodeoxycholová kyselina a α -muricholová kyselina).

Klíčová slova: žlučové kyseliny, HPLC, fluorescenční detekce, derivatizace žlučových kyselin, žluč

Abstract

Aim of the master thesis was the development and the optimization of the HPLC method with fluorescence detection for the determination of the bile acids in the bile of mice. On the basis of literature, the HPLC-FLD method has been proposed and optimized for the quantification of eight bile acids (cholic acid, glycocholic acid, deoxycholic acid, glycodeoxycholic acid, chenodeoxycholic acid, glycochenodeoxycholic acid, α -muricholic acid, and λ -muricholic acid) in the biological material. 1,2-benzo-3,4-dihydrocarbazole-9-ethyl-*p*-toluenesulfonate is suitable derivatization reagent for labeling of the bile acids. The calibration dependences, limits of detection and quantification (in the range of 0.88–1.78 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) for all bile acids are measured. In the biological sample five bile acids have been successfully identified and then determined (cholic acid, glycocholic acid, glycodeoxycholic acid, glycochenodeoxycholic acid, and α -muricholic acid).

Key words: bile acids, HPLC, fluorescence detector, derivatization reaction, bile

Obsah

1	Cíl diplomové práce	9
2	Teoretická část	10
2.1	Žlučové kyseliny	10
2.1.1	Struktura a obecné vlastnosti žlučových kyselin	10
2.1.2	Přehled a vlastnosti studovaných žlučových kyselin	14
2.1.3	Biochemie žlučových kyselin	15
2.1.4	Profily žlučových kyselin u myší	19
2.1.5	Studie změn profilu žlučových kyselin ve žluči myší	21
2.2	Analytické metody pro stanovení žlučových kyselin	22
2.2.1	Elektrochemické metody	22
2.2.2	Chromatografické metody	23
2.2.3	Enzymatické metody	29
2.2.4	Preanalytické úpravy vzorku	29
3	Experimentální část	31
3.1	Analyzované žlučové kyseliny a vzorky	31
3.2	Použité chemikálie	32
3.3	Použité přístroje	32
3.4	Pracovní postupy a vyhodnocení použitých metod	33
3.4.1	Derivatizace žlučových kyselin 2-(bromoacetyl)-6-methoxynaftalenem	33
3.4.2	Derivatizace žlučových kyselin 3-[4-(bromomethyl)fenyl]-7-(diethylamino)- kumarinem	34
3.4.3	Derivatizace žlučových kyselin 2-bromo-2-acetonaftalenem a <i>N,N</i> -diisopropylethylaminem	36
3.4.4	Derivatizace žlučových kyselin 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl- - <i>p</i> -toluensulfonátem	37
3.5	Statistické zpracování naměřených hodnot	39

4	Výsledky a diskuze	40
4.1	Volba derivatizační reakce	40
4.1.1	Derivatizace žlučových kyselin 2-(bromoacetyl)-6-methoxynaftalenem	40
4.1.2	Derivatizace žlučových kyselin 3-[4-(bromomethyl)fenyl]-7-(diethylamino)- kumarinem	41
4.1.3	Derivatizace žlučových kyselin 2-bromo-2-acetonaftalenem a <i>N,N</i> -diisopropylethylaminem	42
4.1.4	Derivatizace žlučových kyselin 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl- - <i>p</i> -toluensulfonátem	43
4.2	Proměření fluorescenčního spektra 1,2-benzo-3,4-dihydrokarb- azol-9-ethyl- <i>p</i> -toluensulfonátu	44
4.3	Optimalizace chromatografických podmínek pro stanovení žlučových kyselin po derivatizaci 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl- <i>p</i> -toluensulfonátem	47
4.3.1	Optimalizace gradientu mobilní fáze	47
4.3.2	Optimalizace rychlosti průtoku mobilní fáze	51
4.3.3	Opakovatelnost retenčních časů	52
4.3.4	Kalibrační závislosti	53
4.4	Stanovení žlučových kyselin ve vzorcích žluči myší	55
5	Závěr	58
	Literatura	59

Seznam použitých zkratk a symbolů

AMCA	α -muricholová kyselina
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
A_s	faktor asymetrie píku
BDETS	1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl- <i>p</i> -toluensulfonát
Br-AMN	2-bromoacetyl-6-methoxynaftalen
c	molární koncentrace [mol dm^{-3}]
CAS	angl. Chemical Abstracts Service
C24	žlučové kyseliny s celkovým počtem uhlíku 24
C27	žlučové kyseliny s celkovým počtem uhlíku 27
CA	cholová kyselina
CDCA	chenodeoxycholová kyselina
CMC	kritická micelární koncentrace
DCA	deoxycholová kyselina
ED	elektrochemický detektor
ELISA	angl. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
FLD	fluorescenční detektor (angl. fluorescence detector)
GCA	glykocholová kyselina
GCDCA	glykochenodeoxycholová kyselina
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
GDCA	glykodeoxycholová kyselina
LMCA	λ -muricholová kyselina
m-AgSAE	rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgámová elektroda
MPAC-Br	3-[4-(bromomethyl)fenyl]-7-(diethylamino) kumarin
n	počet teoretických pater
$R_{1,2}$	rozlišení píku
TDeABr	tetrakis(decyl)ammonium bromid
t_r	retenční čas [min]
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině výšky píku [min]
λ_{em}	emisní vlnová délka [nm]
λ_{ex}	excitační vlnová délka [nm]

1 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Tato diplomová práce vznikla na základě výzkumných projektů Ústavu molekulární genetiky AV ČR, které se věnují monitoringu žlučových kyselin ve žluči myší. Cílem této diplomové práce byl vývoj a optimalizace HPLC metody s fluorescenční detekcí pro stanovení žlučových kyselin ve žluči myší. Bylo vybráno osm žlučových kyselin, pro které byla na základě literatury navržena a následně optimalizována HPLC metoda s fluorescenční detekcí pro jejich kvantifikaci v uvedeném biologickém materiálu.

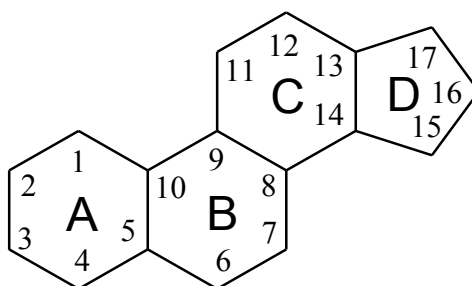
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Žlučové kyseliny

2.1.1 Struktura a obecné vlastnosti žlučových kyselin

Žlučové kyseliny a žlučové alkoholy jsou organické sloučeniny, které se vyskytují v živých organismech, kde plní řadu funkcí. Velké množství jejich typů a jejich chemická různorodost jsou důsledkem evoluce složitých a rozmanitých biochemických pochodů přeměny cholesterolu na ve vodě lépe rozpustné produkty. Žlučové kyseliny byly izolovány ze žluče v 19. století. V té době ještě nebyla známa jejich chemická struktura, a proto je řada žlučových kyselin pojmenována podle organismu, ze kterého byla izolována. Například tauroursodeoxycholová kyselina je pojmenována podle latinského označení pro býka, *taurus*, nebo ursodeoxycholová kyselina podle latinského označení pro medvěda, *ursus* [1, 2].

Žlučové kyseliny jsou organické látky steroidní povahy, syntetizované sledem mnoha reakcí z cholesterolu. Základem struktury všech žlučových kyselin je proto steroidní jádro – steran (obr. 2.1), které je tvořeno třemi šestiuhlíkatými kruhy (označovány A, B, C) a jedním kruhem pětiuhlíkatým (označován D). Kruhy A a B zaujímají vůči sobě *cis/trans* konfiguraci. Žlučové kyseliny se od sebe liší pozicí a množstvím hydroxylových skupin, u savců to je nejčastěji na pozici C3, C7 a C12, a také délkou postranního řetězce, který je navázán na pozici C17. Většina žlučových kyselin reaguje s glycinem a taurinem a tvoří příslušné konjugáty [3–5].



Obr. 2.1 Chemická struktura steranu a schéma jeho číslování.

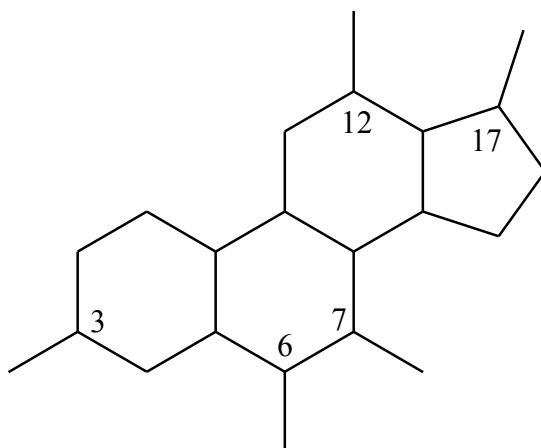
Žlučové kyseliny se rozdělují na základě počtu uhlíkových atomů na dvě velké skupiny [1]:

- a) cholanové žlučové kyseliny, které mají celkový počet uhlíků dvacet čtyři, přičemž na 24 uhlíku je vázána karboxylová skupina a v molekule jsou obvykle hydroxyskupiny vázané na C3 a C7;
- b) cholestanové žlučové kyseliny, které mají celkový počet uhlíků dvacet sedm, v molekule jsou opět obvykle hydroxyskupiny na C3 a na C7.

U savců se s převahou vyskytují cholanové žlučové kyseliny s pětiuhlíkatým řetězcem na C17 [1–4]. V tabulce 2.1 jsou uvedeny struktury žlučových kyselin studovaných v této diplomové práci.

Tabulka 2.1

Struktury žlučových kyselin studovaných v této diplomové práci [1, 6].



kyselina	C3	C6	C7	C12	C17
cholová	α -OH	–	α -OH	α -OH	$-\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$
glykocholová	α -OH	–	α -OH	α -OH	$-\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{COOH}$
chenodeoxycholová	α -OH	–	α -OH	–	$-\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$
glykochenodeoxycholová	α -OH	–	–	–	$-\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{COOH}$
glykodeoxycholová	α -OH	–	–	α -OH	$-\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{COOH}$
deoxycholová	–	–	–	α -OH	$-\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$
α -muricholová	α -OH	β -OH	α -OH	–	$-\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$
λ -muricholová	α -OH	α -OH	α -OH	–	$-\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$

Žlučové kyseliny obsahují v molekule dvě různé části, hydrofobní část a hydrofilní část s jednou nebo až třemi hydroxylovými funkčními skupinami, výjimečně může také obsahovat glukuronátové či sulfátové skupiny [7]. Z toho vyplývá, že žlučové kyseliny jsou amfipatické molekuly. Nejvíce hydrofilní jsou muricholové kyseliny, dále pak hydrofilita dalších žlučových kyselin klesá v řadě následovně: ursodeoxycholová kyselina > cholová kyselina > deoxycholová kyselina > lithocholová kyselina [8]. Konjugáty taurinu jsou hydrofilnější než konjugáty glycinu, což popsali Armstrong et al. [7] při stanovení hydrofilně-hydrofobních vlastností solí za použití HPLC metody s reverzní fází. Hydrofilita žlučových kyselin je tedy ovlivněna jak pozicí, počtem tak i orientací hydroxylových skupin. Ty žlučové kyseliny, které mají ve své molekule více hydroxyskupin, jsou polárnější. Více ale záleží na prostorové orientaci hydroxyskupiny. Pokud se hydroxyskupiny nacházejí pouze v pozici α , molekula žlučové kyseliny je méně hydrofilní než žlučová kyselina, ve které jsou hydroxyskupiny orientovány v β pozici [3, 4, 8].

Žlučové kyseliny, v závislosti na pH vodného prostředí, tvoří ve vodném prostředí micely. Tyto micely se tvoří v úzkém koncentračním rozsahu, jehož průměrná hodnota se označuje jako kritická micelární koncentrace (CMC). Tvorba micel není podmíněna jen hydrofobním efektem, ale také tvorbou vodíkových můstků mezi hydroxylovými skupinami. Kritická micelární koncentrace roste se zvyšujícím se počtem hydroxylových skupin nebo ketoskupin a při stejném počtu substituentů se zvyšuje, pokud je hydroxylová skupina nahrazena ketoskupinou [9]. Důležitou roli hraje také orientace hydroxylových skupin, pokud dojde ke změně orientace z polohy α do polohy β , CMC se zvýší. Jak už bylo výše uvedeno, záleží i na pH vodného roztoku, např. *in vitro* velké množství nekonjugovaných žlučových kyselin je nerozpustných při neutrálním pH, konjugáty s glycinem se špatně rozpouštějí v mírně kyselém prostředí a konjugáty s taurinem jsou rozpustné jen v silně kyselém prostředí. Avšak konjugované žlučové kyseliny mají nepatrně nižší hodnotu CMC než nekonjugované kyseliny [1, 10]. U C24 žlučových kyselin platí, že kyseliny mající dvě hydroxylové skupiny mají nižší hodnotu CMC než kyseliny se třemi hydroxylovými skupinami. Obecně rozpustnost žlučových kyselin konjugovaných s glycinem i těch nekonjugovaných roste s rostoucím pH, do té doby, kdy nedosáhne CMC, jejich rozpustnost se stane prakticky neomezená. Žlučové kyseliny se mohou vyskytovat *in vivo* jako nerozpuštěné protonované kyseliny, jako rozpuštěné protonované kyseliny, jako aniont kyselin, jenž tvoří již zmíněné micely nebo jako nerozpustná sůl s Ca^{2+} . Změnou pH nebo koncentrace Ca^{2+} iontů lze srážet žlučové kyseliny do výše zmíněných nerozpustných forem [10].

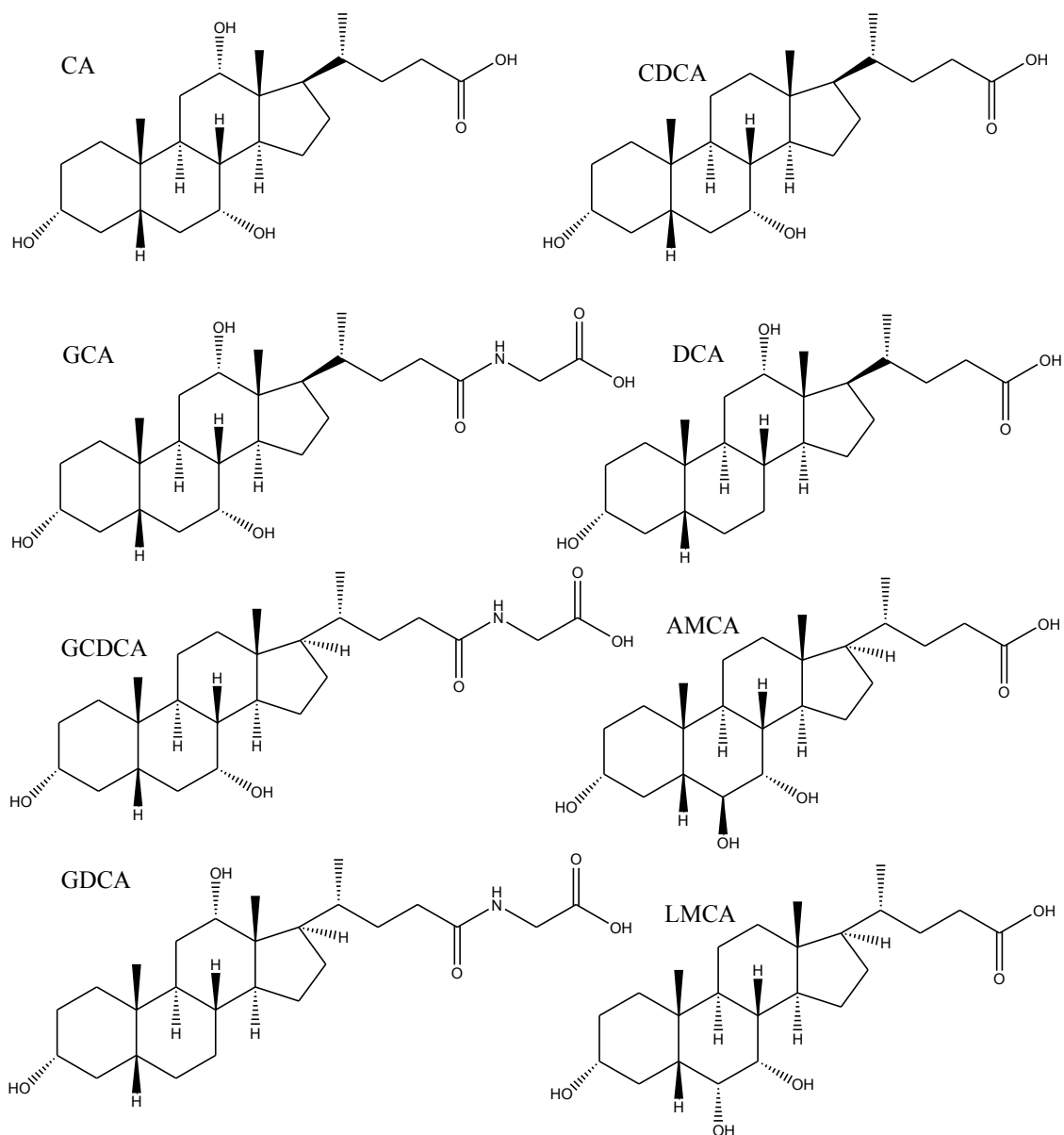
U hodnot pK_a je tomu jinak. Konjugované žlučové kyseliny mají pK_a výrazně nižší vlivem záporného indukčního efektu karbonylové skupiny na amidové vazbě, pK_a glycinem konjugovaných žlučových kyselin se pohybuje okolo hodnoty 4 a u taurinem konjugovaných žlučových kyselin je to dokonce hodnota 1,5 (cit. [11, 12]). Nekongugované žlučové kyseliny mají pK_a vyšší a to okolo hodnoty 5–6. Z toho vyplývá, že při běžných chromatografických analýzách, kdy se užívá rozsah $pH = 3–10$, jsou taurinové konjugáty vždy v ionizované formě. U ostatních žlučových kyselin záleží na pH prostředí [1–4].

V živých organismech se žlučové kyseliny uplatňují zejména v gastrointestinálním traktu. Fungují jako emulgátory kapiček tuků tím, že tvoří společně micely, které zvětšují povrch tuku a usnadňují tím štěpení lipasami. Dále napomáhají rozpouštět a vstřebávat vitamíny rozpustné v tucích [1, 3, 4].

Žlučové kyseliny se také využívají jako farmaka při terapii nedostatečné tvorby žlučových kyselin, onemocnění jater a při rozpouštění žlučových kamenů. Žlučové kyseliny jsou studovány jako hypotetická léčiva proti plísním nebo proti vysoké hladině cholesterolu a jako nosiče pro specifická jaterní farmaka [11]. Například cholová kyselina se využívá k terapii astmatu, k léčbě poruch syntézy žlučových kyselin nebo k léčbě peroxisomálních poruch. Deoxycholová kyselina je součástí imunomodulátorů, protizánětlivých látek a choleretik. Ursodeoxycholová kyselina je také součástí choleretik. U muricholové kyseliny bylo prokázáno, že velmi účinně snižuje riziko vzniku cholesterolových kamenů nebo se uplatňuje při jejich léčbě u myší [1, 13, 14]. Naopak jako nejvíce toxická žlučová kyselina se jeví lithocholová kyselina. Například při obstrukci žlučových cest dochází k akumulaci žlučových kyselin v játrech a ty toxicky působí na okolní tkáň. U myší, kde byla obstrukce simulována podvázáním žlučovodů, se objevily charakteristické lokální nekrózy v jaterním parenchymu [15, 16]. Dále pak Woolbright et al. [15] prokázali, že akumulace lithocholové kyseliny a jejích metabolitů u myší, jimž byla lithocholová kyselina podávána, vede k akumulaci lithocholové kyseliny v intralobulárních žlučovodech a uzávěru žlučového systému, připomínající cholestázu při podvázání žlučovodů a indukuje fibrózu jater.

2.1.2 Přehled a vlastnosti studovaných žlučových kyselin

Strukturní vzorce osmi žlučových kyselin studovaných v této diplomové práci jsou zobrazeny na obr. 2.2, jejich fyzikální a chemické vlastnosti jsou přehledně shrnuty v tabulce 2.2.



Obr. 2.2 Strukturní vzorce studovaných žlučových kyselin: cholová kyselina (CA), chenodeoxycholová kyselina (CDCA), glykocholová kyselina (GCA), deoxycholová kyselina (DCA), glykochenodeoxycholová kyselina (GCDCA), α -muricholová kyselina (AMCA), λ -muricholová kyselina (LMCA).

Tabulka 2.2

Vybrané charakteristiky žlučových kyselin studovaných v této diplomové práci (registrační číslo v CAS, sumární vzorec, molární hmotnost, teplota tání, rozpustnost ve vodě při 20 °C a disociační konstanta ve vodě, podle [1,17–22]).

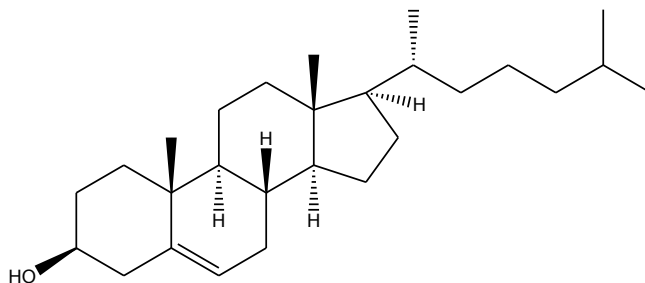
kyselina	CAS RN	sumární vzorec	M g mol ⁻¹	t_f °C	rozpustnost mg l ⁻¹	pK_a
cholová	81-25-4	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	408,57	198	175	4,98
glykocholová	475-31-0	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆	465,62	166,5	3,3	3,8
chenodeoxycholová	474-25-9	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	392,57	168–171	89,9	4,6
glykochenodeoxycholová	640-79-9	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	449,63	– ^a	3,15	3,5
glykodeoxycholová	360-65-6	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	449,63	– ^a	– ^a	3,77
deoxycholová	83-44-3	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	392,58	176–178	43,6	6,58
α-muricholová	2393-58-0	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	408,57	188–193	– ^a	4,6
λ-muricholová	547-75-1	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	408,57	182–186	– ^a	4,6

^a hodnota není v literatuře dostupná

2.1.3 Biochemie žlučových kyselin

Žlučové kyseliny, které se syntetizují v játrech, jsou nazývány jako primární kyseliny. Z těchto primárních žlučových kyselin, mohou působením bakterií vznikat sekundární žlučové kyseliny.

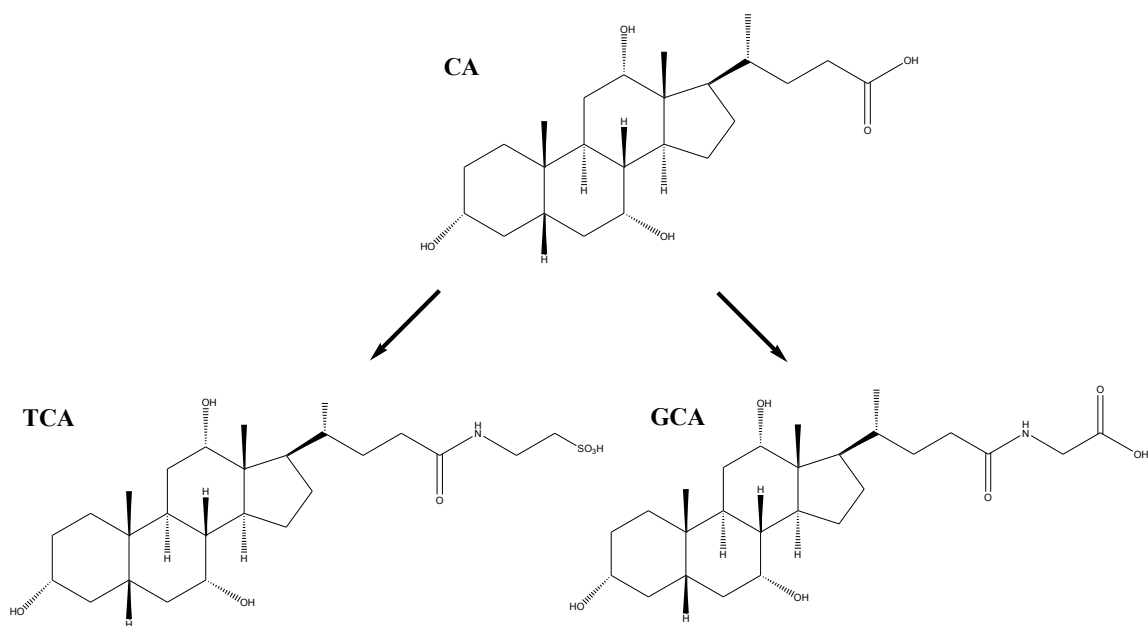
K biosyntéze žlučových kyselin z cholesterolu (obr. 2.3) dochází v jaterních buňkách, které mají výbornou schopnost přeměnit lipofilní látky na látky ve vodě dobře rozpustné, snadněji vylučitelné z jater do žluče. Jedná se o sled reakcí velmi blízkých standardnímu metabolismu, kdy dochází k eliminaci lipidů a xenobiotik. Jde hlavně o hydroxylaci, oxidaci a konjugaci. Vznik žlučových kyselin je katalyzován nejméně sedmnácti enzymy [1, 23]. Jde o hlavní mechanismus odbourávání cholesterolu u savců [24].



Obr. 2.3 Strukturní vzorec cholesterolu.

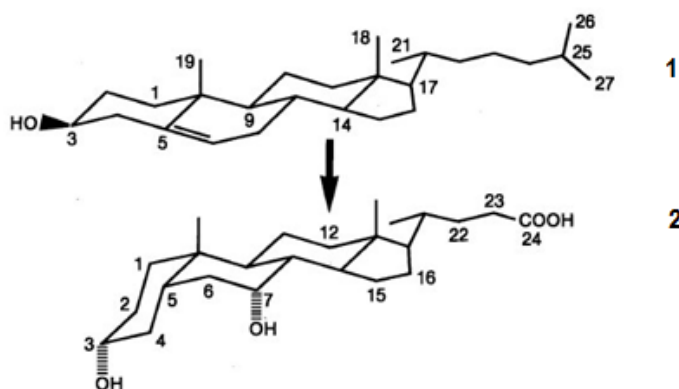
Cholesterol je dvaceti sedmi uhlíkatý steroid, jehož základní strukturou je steran, na jehož desátý a třináctý uhlík jsou navázány dvě methylové skupiny, isooktanový řetězec je na sedmnáctém uhlíku a dvojná vazba na uhlíku pátém [24]. Zdrojem cholesterolu v organismu jsou živočišné tuky, které jsou dodávány potravou, nebo může být v organismu syntetizován. Syntéza cholesterolu *de novo* probíhá hlavně v játrech z acetylkoenzymu A, tuto reakci katalyzuje HGM-AcetylCoA syntasa. Cholesterol je nedílnou součástí biologických membrán, je také prekurzorem vitamínu D a steroidních hormonů, jako jsou kortikoidy, androgeny, estrogeny a gestageny. Jak již bylo zmíněno, je také důležitý pro syntézu žlučových kyselin [24, 25]. V krvi se váže na proteiny a s nimi je transportován.

Metabolismus cholesterolu začíná nasycením dvojně vazby mezi C5 a C6, dále pak pokračuje epimerizací 3 β -hydroxylové skupiny a nakonec může dojít k zavedení hydroxylových skupin či oxoskupin na pozice 7 α a 12 α [12, 25]. Limitním krokem biosyntézy žlučových kyselin je zavedení α -hydroxyskupiny na C7, tento krok katalyzuje enzym 7 α -hydroxylasa [1]. Následující reakcí je oxidace osmi uhlíkatého postranního řetězce, který je navázán na C17, dochází k oxidaci na C24 a vzniká karboxylová kyselina. Po biosyntéze C24 žlučových kyselin je potřeba danou kyselinu aktivovat acetylkoenzymem A a následně konjugovat. C27 žlučové kyseliny jsou konjugovány výhradně taurinem a C24 žlučové kyseliny mohou být konjugovány jak taurinem, tak glycinem [1]. Konjugací vzniká amidová vazba mezi karboxylem žlučové kyseliny a aminoskupinou glycinu popřípadě taurinu [23], tyto konjugace jsou znázorněny na obr. 2.4. Jak už bylo zmíněno glykokonjugáty a taurokonjugáty mají výrazně nižší pK_a a proto se lépe rozpouštějí v alkalickém prostředí tenkého střeva, kde se podílejí na tvorbě micel a emulgaci tuků. Jsou také důležité pro vstřebávání v tukích rozpustných vitaminů A, D, E, K [25, 26].



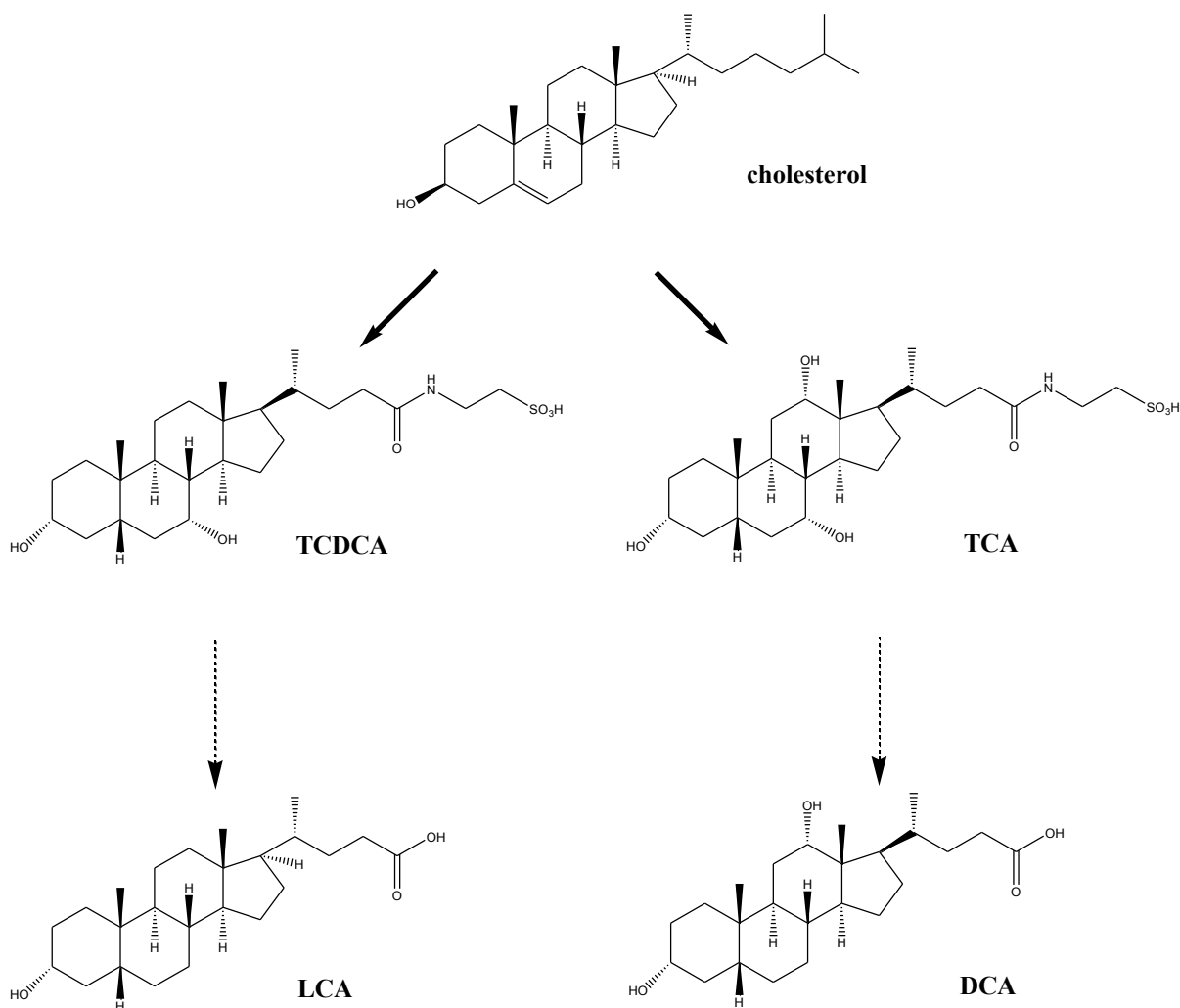
Obr. 2.4 Schéma transformace cholové kyseliny (CA) na taurocholovou (TCA) nebo glykocholovou kyselinu (GCA).

Další méně častou možností konjugace je sulfatace, esterová glukuronidace, C7 *N*-acetylglukosaminace a etherová konjugace na jádře. Tímto způsobem vznikají primární žlučové kyseliny, jak už bylo uvedeno, jde o cholovou kyselinu a chenodeoxycholovou kyselinu, při jejíž biosyntéze z cholesterolu dochází k epimerizaci 3β -hydroxylové skupiny, k redukci dvojné vazby na C5, následně dojde k hydroxylaci na C7 a nakonec k β -oxidaci na postranním řetězci, kdy z isooktanového řetězce vzniká izopentanový řetězec (obr. 2.5). Například u medvědů byla nalezena ursodeoxycholová kyselina, při jejíž biosyntéze probíhá epimerizace 7α -hydroxyskupiny na $3\alpha,7\beta$ -dihydroxy žlučovou kyselinu [1].



Obr. 2.5 Konverze (1) cholesterolu na (2) chenodeoxycholovou kyselinu (převzato z [1]).

Vzniklé primární žlučové kyseliny jsou následně vedeny žlučí do střev, kde pod vlivem působení mikroorganismů jsou modifikovány oxidačními a epimerizačními reakcemi. Dochází k odštěpení hydroxylových skupin, tento krok katalyzují hydrolasy; například enzym 7 α -dehydroxylasa katalyzuje odštěpení hydroxyskupiny z C7, tento enzym se nachází u několika kmenů střevní bakterie *Clostridium* [27]. Hlavně dochází ale k dekonjugaci aminokyselin působením enzymů ze skupiny hydrolas, které se nachází ve většině střevních bakterií. Tímto způsobem vznikají sekundární žlučové kyseliny, mezi které patří lithocholová kyselina, která vzniká z chenodeoxycholové kyseliny a nebo deoxycholová kyselina z cholové kyseliny (obr. 2.6). U hlodavců pak vzniká hlavně ω -muricholová a murideoxycholová kyselina biotransformací z primární muricholové kyseliny [28, 29]. Zde byla uvedena klasická biosyntéza žlučových kyselin, ale u myši syntéza primárních žlučových kyselin může probíhat i jiným způsobem. King [30] uvádí, že až z 25 % může biosyntéza probíhat neklasickými cestami, například hydroxylací cholesterolu na C27 za účasti mitochondriálního enzymu sterol-27-hydroxylasy. Většina žlučových kyselin podléhá enterohepatálnímu cyklu, až 95 % žlučových kyselin je ze střeva transportováno portální krví zpět do jater, kde dochází k další biotransformaci a opětovnému vyloučení do žluče [24, 31].



Obr. 2.6 Schéma biosyntézy primárních žlučových kyselin taurochenodeoxycholové kyseliny (TCDCA) a taurocholové kyseliny (TCA) z cholesterolu a následná biosyntéza sekundárních žlučových kyselin lithocholové kyseliny (LCA) a deoxycholové kyseliny (DCA).

2.1.4 Profily žlučových kyselin u myší

Jelikož se tato diplomová práce zabývá stanovením žlučových kyselin v myší žluči, v této kapitole je popsán profil žlučových kyselin v myších biologických materiálech.

Podle literatury [23] je celková koncentrace žlučových kyselin v myších játrech $181,3 \mu\text{g g}^{-1}$, podle dalších předešlých studií se obsah žlučových kyselin v myších játrech pohybuje v rozmezí $20\text{--}618 \mu\text{g g}^{-1}$. Zastoupení žlučových kyselin v játrech myší je následovné: 97,7 % jsou konjugované žlučové kyseliny s taurinem, 2,2 % tvoří

nekonjugované kyseliny a méně než 0,1 % tvoří konjugáty žlučových kyselin s glycinem.

V myší žluči bylo celkové množství žlučových kyselin stanoveno v rozmezí od 16 do 102 mg ml⁻¹, takto velká variabilita je zapříčiněna metodou vzorkování, rozdílnými kmeny myší a stejně tak používanými analytickými metodami. V žluči je zastoupení s výjimkou nekonjugovaných kyselin obdobné jako v játrech: 99,6 % tvoří konjugované žlučové kyseliny s taurinem, 0,4 % nekonjugované žlučové kyseliny a 0,1 % tvoří žlučové kyseliny konjugované glycinem. Zastoupení konjugátů s taurinem je v myší žluči v porovnání se žlučí lidskou větší, protože enzym, který je zodpovědný za konjugaci žlučových kyselin s aminokyselinami u myší, je specifický právě pro taurin. Toto tvrzení platí ale jen u myší, u potkanů a u lidí je tomu naopak, zde jsou majoritně zastoupené právě konjugáty žlučových kyselin s glycinem.

Během stanovení profilu hraje významnou roli doba vzorkování. Alnouti et al. [23] popsali pokles vylučování celkového množství žlučových kyselin do žluče z 1800 µg za prvních 15 min na 589 µg za posledních 15 min (vzorkování probíhalo každých 15 min po dobu dvou hodin). Tato skutečnost je pravděpodobně zapříčiněna snížením průtoku žluči. Podrobnější profil žlučových kyselin z kvantitativního hlediska v myší žluči je popsán v tabulce 2.3, tento profil byl sestaven na základě literatury [23] a na základě informací dodaných Ústavem molekulární genetiky AV ČR. Velký rozptyl kvantitativního zastoupení žlučových kyselin ve žluči, může být způsoben použitými metodami pro jejich stanovení, stářím a rodem myší, způsobem vzorkování (doba celkového vzorkování, četnost odběrů) a uchovávání vzorku.

Tabulka 2.3

Zastoupení vybraných žlučových kyselin v myší žluči různého stáří. Data u 8 týdnů staré myši byla převzata z literatury [23], data u 4 týdnů staré myši od pracovníků Ústavu molekulární genetiky AV ČR.

žlučová kyselina	c µmol dm ⁻³	
	8 týdnů staré myši	4 týdnů staré myši
cholová	52,5–88,5	2560,0
glykocholová	13,8–23,3	187,0
chenodeoxycholová	9,6–16,3	— ^a
deoxycholová	9,6–16,3	4,5
glykodeoxycholová	8,4–14,2	5,5
glykochenodeoxycholová	1,6–2,9	3,0
α-muricholová	— ^a	161,0
λ-muricholová	0,08–0,13	276,0

^a hodnota není dostupná

V myším séru bylo stanoveno množství žlučových kyselin řádově tisíckrát menší, než tomu je ve žluči. V literatuře se udává množství žlučových kyselin v myším séru v rozmezí 0,20–7,65 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Toto velké rozmezí je vysvětlováno faktem, že v séru jsou nalezeny další polární formy resp. polyhydroxylované a sulfatované metabolity a žlučové kyseliny konjugované s glukuronovou kyselinou.

V myší moči bylo detekováno jen stopové množství celkového obsahu žlučových kyselin [23].

2.1.5 *Studie změn profilu žlučových kyselin ve žluči myši*

Žlučové kyseliny jsou v rámci výzkumných projektů Ústavu molekulární genetiky AV ČR studovány, protože náhlé změny jejich přítomnosti, nepřítomnost či změna množství mohou signalizovat poruchy metabolismu ale i mnoho častých chorob. Dosud provedené studie ukázaly, že žlučové kyseliny nejsou jen biologické detergenty, které napomáhají absorpci tuků, ale mohou se i podílet na regulaci metabolismu glukosy a lipidů. Farmakologická úprava metabolismu žlučových kyselin nebo jejich signálních drah by mohla být součástí strategie léčby obezity a diabetu. Na druhou stranu signální dráhy žlučových kyselin fungují jako komplex a celkový mechanismus není dosud úplně objasněn [13].

Dalším důvodem studia žlučových kyselin je problematika cholestatického onemocnění jater, toto onemocnění může být způsobené genetickými defekty, užíváním toxických drog, zneprůchodněním žlučových cest nebo maligními útvary ve žlučových cestách. Cholestáza vede k akumulaci žlučových kyselin v hepatocytech. Právě největším předpokladem pro cholestatické poškození jater je přímý vliv akumulovaných toxických žlučových kyselin. Avšak je otázkou, které ze žlučových kyselin se právě během cholestázy v žlučových cestách hromadí. Proto se studuje jak kvantitativní, tak kvalitativní složení žlučových kyselin v žluči a séru myši zejména po chirurgickém zákroku, kdy dojde k podvázání žlučodů myši, a tím dochází k navození podmínek, jako při cholestatickém onemocnění jater. Poté se kvantitativně i kvalitativně analyzuje žluč i sérum a hodnotí se toxicita nejhojněji zastoupených žlučových kyselin. Je nutno ale brát v potaz, že kvantitu a kvalitu žlučových kyselin ve žluči ovlivňuje stáří myši, ze které je vzorek odebírán a jakým způsobem odebírání vzorků probíhá [32].

2.2 Analytické metody pro stanovení žlučových kyselin

Vzhledem k tomu, že cílem této diplomové práce je stanovení žlučových kyselin ve žluči myší, je potřeba připomenout, že v tělních tekutinách, jak ve žluči tak popřípadě v séru jsou žlučové kyseliny obsaženy řádově mikromolárních až nanomolárních koncentracích. Takto nízké koncentrace komplikují stanovení žlučových kyselin v porovnání s laboratorními podmínkami [33]. Separace a následná detekce žlučových kyselin nese s sebou několik úskalí. Jedním z nich je nízká absorbance žlučových kyselin v UV oblasti (komplikace u HPLC-UV detekce), malá těkavost (komplikace u GC) a v neposlední řadě vysoké redoxní potenciály pro elektrochemickou oxidaci, nebo redukci (komplikace u HPLC-ED). Proto stanovení žlučových kyselin vyžaduje buď jejich nutnou derivatizaci nebo použití instrumentálně a finančně náročných detekčních systémů jakými jsou HPLC ve spojení s hmotnostní detekcí. Musí být zároveň zvoleny takové metody, které jsou vhodné pro separaci a detekci látek, které mají velice podobné struktury a jsou součástí biologických a fyziologických matric. Tato kritéria splňují vybrané metody elektroanalytické, ale také chromatografické dále pak imunochemické a enzymatické [34–36].

2.2.1 *Elektrochemické metody*

Vzhledem k tomu, že žlučové kyseliny vykazují nízkou elektrochemickou aktivitu, nejsou elektrochemické metody pro stanovení žlučových kyselin běžné. HPLC a GC metody s vhodnými detektory jsou velice finančně náročné a v neposlední řadě celá aparatura vyžaduje nemalé prostory. Nastává také problém v případě nutnosti použití toxických činidel a rozpouštědel. Proto je snaha o vyvinutí levnějších a méně náročných metod, jako by mohly být metody elektroanalytické. O elektrochemické aktivitě žlučových kyselin je prozatím omezené množství poznatků. Při stanovování žlučových kyselin analytickými metodami nastává problém při výběru vhodných základních elektrolytů, elektrodových materiálů a rozpouštědel, protože jak elektrochemická oxidace, tak redukce žlučových kyselin nastává až v oblasti vysokých kladných a záporných potenciálů [37].

Ferri et al. [38] studovali žlučové kyseliny, konkrétně cholovou, deoxycholovou, ursodeoxycholovou a lithocholovou kyselinu, za použití diferenční pulzní polarografie. Všechny zkoumané žlučové kyseliny až na lithocholovou kyselinu byly stanovitelné

při $\text{pH} \geq 4,0$, lithocholová kyselina je elektroaktivní až při $\text{pH} \geq 10,0$. Při stanovení cholové, deoxycholové a ursodeoxycholové kyseliny byla dosažena největší reprodukovatelnost a citlivost při $\text{pH} = 5,25$ v prostředí fosfátového a octanového pufru a při iontové síle $0,4 \text{ mol dm}^{-3}$.

Pro stanovení deoxycholové kyseliny bylo vyvinuto stanovení metodou cyklické voltametrie v prostředí methanol a vodný roztok dihydrogenfosforečnanu draselného, při níž byla sledována redukce deoxycholové kyseliny na elektrodě ze skelného uhlíku modifikované vícevrstevnými uhlíkovými nanotrubičkami. Rychlost scanu byla nastavena na $0,1 \text{ V s}^{-1}$, pík deoxycholové kyseliny byl pozorován při potenciálu okolo $+0,65 \text{ V}$. Při sledování pH závislosti bylo zjištěno, že při silně kyselém pH prostředí jsou proudy píků deoxycholové kyseliny vyšší než při pH neutrálním nebo zásaditým. Reakce na elektrodě byla řízena difúzí [39].

Naopak oxidací žlučových kyselin se zabývali Medici et al. [40], kteří studovali nepřímou elektrochemickou oxidaci cholové kyseliny na různých anodách; jako základní elektrolyt byl použit chloristan sodný a reakce probíhaly v zásaditém vodném prostředí. Pro oxidaci cholové kyseliny použili jako mediátor elektronového přenosu chloridový aniont. Byly zkoumány následující elektrodové materiály: PbO_2 anoda, na níž byla cholová kyselina kvantitativně přeměněna na dehydrocholovou kyselinu, platinová elektroda, na níž z cholové kyseliny vznikala 7-ketocholová kyselina, a GCE, kde byla cholová kyselina v závislosti na podmínkách kvantitativně přeměněna na dehydrocholovou kyselinu nebo vznikla směs oxidačních produktů a dehydrocholové kyseliny [41].

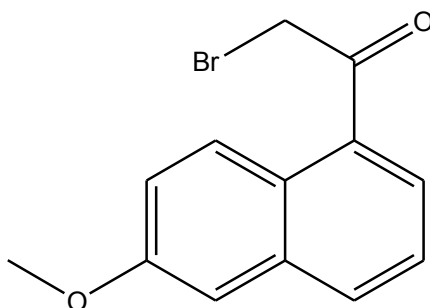
2.2.2 *Chromatografické metody*

Pro separaci a stanovení žlučových kyselin byla dříve používána chromatografie na tenké vrstvě. Touto metodou však nebylo možné oddělit od sebe taurinové a glycinové konjugáty [42]. Běžnou používanou metodou byla plynová chromatografie a její kombinace s hmotnostní spektrometrií [42, 43], ale ta byla následně nahrazena kapalinovou chromatografií v kombinaci s hmotnostní spektrometrií a tandemovou hmotnostní spektrometrií.

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout a optimalizovat jednoduchou a levnou HPLC metodu pro stanovení žlučových kyselin v myší žluči. Na rozdíl od finančně náročné HPLC metody s hmotnostním detektorem byla zvolena HPLC metoda

s fluorimetrickou detekcí. Fluorescenční detektor má vysokou citlivost, je proto vhodný pro stanovení analytů s nízkými koncentracemi. Na druhou stranu tento detektor vyžaduje, aby analyt poskytoval fluorescenční odezvu, což v případě stanovovaných žlučových kyselin znamená, že je třeba je před vlastní HPLC separací derivatizovat. V literatuře byly dosud popsány níže uvedené tři metody derivatizace žlučových kyselin vhodné pro jejich následné stanovení metodou HPLC-FLD. Čtvrtý použitý postup, dosud nepopsaný v literatuře, byl vyvinut pro stanovení žlučových kyselin v laboratořích Ústavu molekulární genetiky AV ČR.

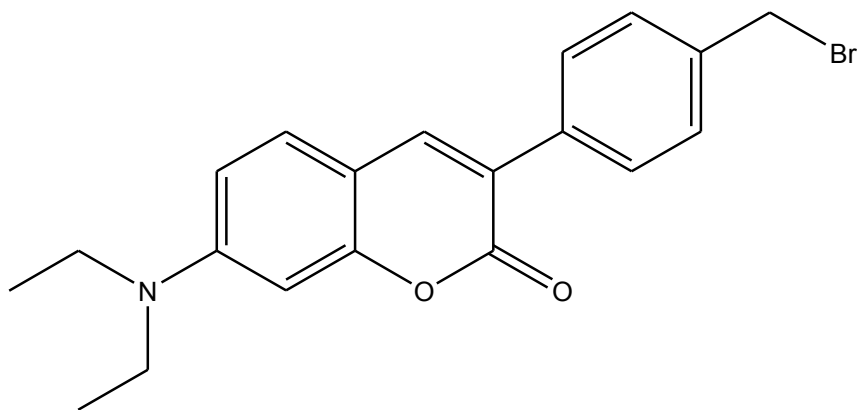
Gatti et al. [44] vypracovali metodu pro HPLC-FLD stanovení konjugovaných žlučových kyselin taurinem a glycinem i nekonjugovaných žlučových kyselin v krevním lidském séru, konkrétně ursodeoxycholové kyseliny, cholové kyseliny, chenodeoxycholové kyseliny, deoxycholové kyseliny a litholové kyseliny. Limit detekce této metody ve vzorku séra je 1–2 pmol. K derivatizaci žlučových kyselin byl použit 2-(bromoacetyl)-6-methoxynaftalen (obr. 2.7). Derivatizační reakce probíhá ve vodném prostředí za přítomnosti tetrakis(decyl)ammonium bromidu. HPLC analýza je prováděna na koloně Ultracarb 5 ODS (250×4,6 mm), za použití binární gradientové eluce, kde jednou fází je destilovaná voda a druhou fází směs acetonitril:methanol (60:40, v/v). Produkty derivatizační reakce jsou detegovány při $\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$.



Obr. 2.7 Strukturní vzorec 2-(bromoacetyl)-6-methoxynaftalenu.

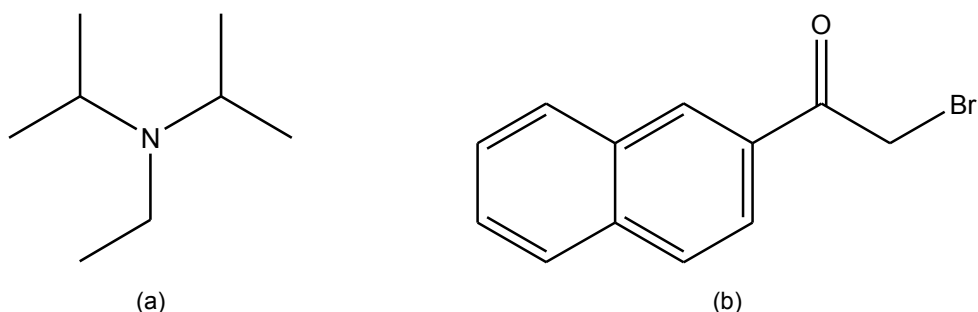
Metodu pro HPLC-FLD separaci směsi šestnácti žlučových kyselin včetně stereoizomerů pro analýzu 24-hydroxylovaných stereoizomerních intermediátů během β -oxidace biosyntézy žlučových kyselin v tkáni krysích jater vypracovali Kurosawa et al. [45]. Limit detekce této metody je 15 fmol. Derivatizačním činidlem je 3-[4-(bromomethyl)fenyl]-7-(diethylamino) kumarin (obr. 2.8), reakce se provádí v prostředí acetonitrilu za přítomnosti 0,4% 18-crown-6 saturovaného

hydrogenuhličitanem draselným. HPLC analýza probíhá na koloně Intersil C8 (250×4,6 mm) pomocí binární gradientové eluce, kde jednou fází je směs TRIS pufru o koncentraci 20 mmol dm⁻³ (pH = 7,5):methanol (22:78, v/v), druhou fází pak směs TRIS pufr o koncentraci 20 mmol dm⁻³ (pH = 7,5):methanol (10:90, v/v). Produkty derivatizační reakce byly detegovány při $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 475 \text{ nm}$.



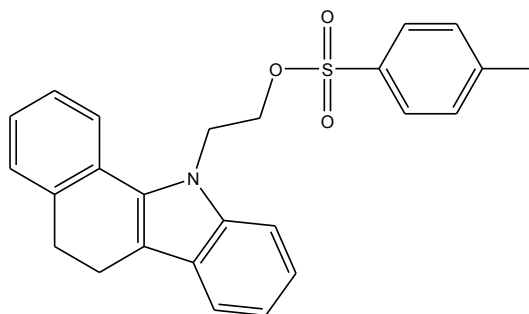
Obr. 2.8 Strukturní vzorec 3-[4-(bromomethyl)fenyl]-7-(diethylamino) kumarinu.

Třetí metoda pro derivatizaci žlučových kyselin je založena na reakci žlučové kyseliny s 2-bromo-2-acetonaftalenem a *N,N*-diisopropylethylaminem (obr. 2.9). Tento postup byl standardním nepublikovaným postupem používaný pro derivatizaci desíti konjugovaných i nekonjugovaných žlučových kyselin v laboratoři Ústavu molekulární genetiky AV ČR. Derivatizační reakce probíhá v prostředí acetonitrilu. Produkty derivatizační reakce jsou analyzovány na oktadecylové koloně (220×4,6 mm) použitím binárního gradientu, kdy jednou složkou je acetonitril a druhou složkou destilovaná voda. Produkty derivatizační reakce jsou detegovány při $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 475 \text{ nm}$.

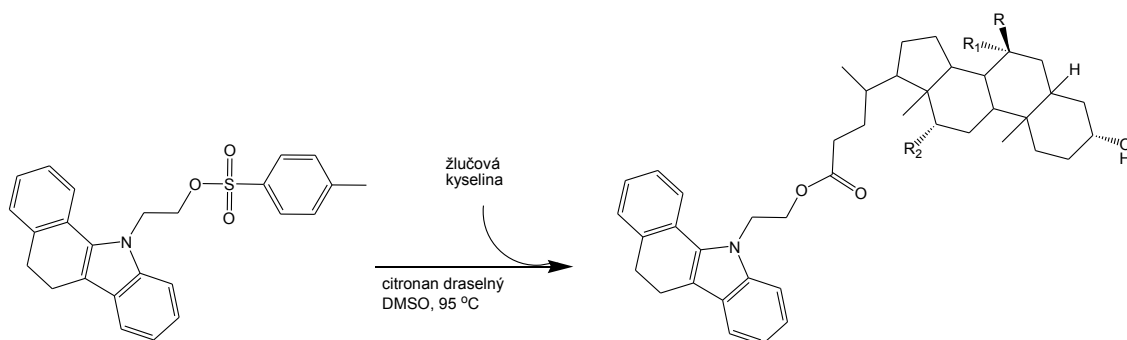


Obr. 2.9 Strukturní vzorec (a) *N,N*-diisopropylethylaminu, (b) 2-bromo-2-acetonaftalenu.

Nejnovější derivatizační postup pro stanovení žlučových kyselin metodou HPLC-FLD je postup navržen Jinmao et al. [6]. Jako derivatizační činidlo použili 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonát (obr. 2.10) pro stanovení cholové, ursodeoxycholové, chenodeoxycholové, deoxycholové a lithocholové kyseliny jak ve volné tak v konjugované formě v lidském séru s následnou identifikací pomocí FLD a zároveň hmotnostního detektoru s APCI. Limit detekce této metody je v rozmezí 13-22 fmol. Na obr. 2.12 je znázorněna reakce derivatizačního činidla se žlučovou kyselinou, která probíhá v prostředí dimethylsulfoxidu za katalýzy citronanem draselným. Produkty derivatizační reakce jsou analyzovány na koloně Hypersil C18 (200×4,6 mm) pomocí binární eluce, kdy jednou fází je acetonitril a druhou fází směs vodného roztoku mravenčanu amonného o koncentraci 40 mmol dm⁻³ (pH = 3,56):acetonitril (50:50, v/v). Produkty derivatizační reakce jsou detegovány při $\lambda_{\text{ex}} = 333 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 390 \text{ nm}$.



Obr. 2.10 Strukturní vzorec 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonátu.



Obr. 2.11 Schéma derivatizační reakce žlučové kyseliny s 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonátem.

Pro stanovení 3-sulfátových a nesulfátových derivátů žlučových kyselin vyvinuli Hirano et al. [46] HPLC metodu s fluorometrickou detekcí ($\lambda_{\text{ex}} = 345 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$), jejíž principem je solvolýza trifluoroctovou kyselinou o koncentraci 1 mol dm^{-3} za přítomnosti tetrahydrofuranu a dioxanu. Analýza probíhá na koloně Enzyme Pak-HSD za pomoci binární gradientové eluce, jejímiž složkami je acetonitril a fosfátový pufr o koncentraci 10 mmol dm^{-3} ($\text{pH} = 7,80$). Tato metoda byla použita pro analýzu žlučových kyselin v séru pacientů se žloutenkou posthepatálního původu. Během analýzy byl fluometricky detekován redukovaný NAD^+ , který byl produkován enzymatickou reakcí mezi 3 α -hydroxysteroid dehydrogenasou a žlučovými kyselinami.

Další v dnešní době používanou metodou pro stanovení žlučových kyselin v biologickém materiálu je spojení HPLC metody s hmotnostní spektrofotometrií, která patří mezi metody nejcitlivější, ale také za finančně a technicky nejnáročnější. V praxi se používá pro monitorování hladin žlučových kyselin u těhotných žen s intrahepatální cholestázou [47].

Huang et al. [48] pomocí LC-MS/MS metody studovali žlučové kyseliny a jejich sulfatované metabolity, které jsou hlavními produkty intoxikace žlučových kyselin. Studie proběhla v myši plasmě, játrech, žluči a moči. Analýza žlučových kyselin a jejich sulfatovaných metabolitů probíhá na koloně ACQUITY UPLC BEH Phenyl chráněné předkolonkou ACQUITY UPLC C18. Složky binárního gradientu byly methanol a vodný roztok octanu amonného o koncentraci $7,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ($\text{pH} = 7,0$).

Mi et al. [49] vyvinuli HPLC-MS/MS metodu s vysokou výtěžností, kterou bylo možné stanovit 19 sloučenin, žlučových kyselin a jejich taurokonjugátů a glykokonjugátů během 12 minut. Analýza probíhá na koloně Ascentis Express C18 pomocí binární gradientové eluce, jejímiž složkami jsou destilovaná voda s přísadkou 0,1% mravenčí kyseliny a mravenčanu amonného o koncentraci 5 mmol dm^{-3} a směs methanol:acetonitril (1:3, v/v) s přísadkou 0,1% mravenčí kyseliny a mravenčanu amonného o koncentraci 5 mmol dm^{-3} . Studie byla aplikována na žluči selat, ale je možné ji použít k analýze žlučových kyselin v jiných biologických materiálech.

Samozřejmě se ale využívá i dalších detektorů pro analýzu žlučových kyselin v biologických matricích. Jak už bylo zmíněno ursodeoxycholová kyselina se často využívá jako choleretikum. Při stanovení ursodeoxycholové kyseliny v léčivech je využívána HPLC metoda s elektrochemickou detekcí [50], kde jako mobilní fáze je použita směs methanolu, acetonitrilu a octanového pufru o koncentraci $0,7 \text{ mol dm}^{-3}$ ($\text{pH} = 5,0$). Ursodeoxycholová kyselina byla separována na koloně s oktadecylovou reverzní fází. Součástí elektrochemického detektoru byla analytická cela, tvořená

in-line pórovitými uhlíkovými elektrodami pracujícími s oxidačními proudy o velikosti +0,6 V a +1,4 V. Tato metoda je selektivní a dostatečně citlivá pro stanovení ursodeoxycholové kyseliny v uvedeném vzorku. Bylo dokázáno, že stanovení pomocí elektrochemického detektoru je citlivější, než stanovení pomocí UV detektoru při vlnové délce 210 nm [50]. Ke zvýšení citlivosti UV detekce při HPLC stanovení je nezbytná preanalytická úprava a to derivatizace žlučových kyselin. Arakii et al. [51] se podařilo derivatizovat kyselinu cholovou na *N*-nitroso derivát, který specificky absorbuje UV záření při 285 nm, a následně stanovit metodou RP-HPLC s UV detekcí. Cholovou kyselinu lze také zderivatizovat na *N*-nitrosoglyko derivát a následně stanovit v pufrch o kyselém a neutrálním pH.

Pro stanovení nekonjugovaných kyselin ve stolici vyvinul Kakiyama et al. [52] RP-HPLC-UV metodu. Byla provedena nezbytná úprava vzorku, izolace a následná derivatizace a převedení žlučových kyselin na 24-fenacylové estery. Vzniklé produkty byly separovány HPLC metodou na koloně Nova-Pac C18 a spektrofotometricky detegovány při vlnové délce $\lambda = 254$ nm. Jako mobilní fáze byl použit 82% methanol. Této metody bylo využito při stanovení celkové koncentrace a při monitorování koncentrací žlučových kyselin ve stolici pacientů s cirhózou jater.

Méně častou metodou pro stanovení žlučových kyselin je kapilární zónová elektroforéza. Výhody HPLC a kapilární zónové elektroforézy byly spojeny v jednu a to v kapilární elektrochromatografii, která je miniaturizovanou metodou pro stanovení žlučových kyselin. Nověji je pak používána metoda tlaková kapilární elektrochromatografie. Tato metoda byla použita Wu et al. [33] pro stanovení cholové, deoxycholové, ursodeoxycholové a lithocholové kyseliny. Principem metody byla reakce žlučových kyselin s 4-nitro-7-piperazino-1,2,3-benzoxadiazolem, aktivačními činidly byly 2,2'-dipyridyl disulfid a trifenyfosfin. Produktem této reakce je fluorescence schopný amid, který je detekovatelný za pomoci laserem indukované fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 473$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 530$ nm). Žlučové kyseliny byly separovány za izokratických podmínek a mobilní fází byla směs pufru s přídavkem *N*-cyklohexyl-3-aminopropan-sulfonové kyseliny a acetonitrilu.

Dalším způsobem, jak stanovit žlučové kyseliny, je iontová chromatografie, která využívá aniontovou výměnu při vysokém pH s pulzní ampérometrickou detekcí. Žlučové kyseliny byly rozpuštěny v hydroxidu sodném o koncentraci 0,8 mol dm⁻³ a v 8% acetonitrilu. Pro separaci žlučových kyselin byla použita kolona s hydrofobním charakterem a izokratická eluce, jako mobilní fáze byla použita směs octanu sodného a acetonitrilu [53].

2.2.3 *Enzymatické metody*

Pro stanovení 7-*N*-acetylglukosaminidů ursodeoxycholové kyseliny, která je specifickým ukazatelem primární biliární cirhózy, byla vytvořena selektivní metoda ELISA. Pro tuto metodu byly izolovány protilátky z myší sleziny [54].

Dále také bylo provedeno experimentální stanovení celkového množství žlučových kyselin v organismu pomocí tenkovrstvého tištěného Ir/C senzoru s 3- α -hydroxysteroid dehydrogenasou na povrchu. Touto metodou bylo stanoveno enzymaticky vyprodukované množství NADH, které vzniká při reakci enzymu s cholátem sodným za přítomnosti taurochenodeoxycholové kyseliny a taurocholové kyseliny, na základě tohoto stanovení bylo možné zjistit celkové množství žlučových kyselin v organismu. Experimentální měření byla prováděna při konstantním potenciálu +0,27 V, byl použit vzorek hovězího séra ve fosfátovém pufru proti argentchloridové elektrodě [55].

2.2.4 *Preanalytické úpravy vzorku*

V této diplomové práci byly stanovovány žlučové kyseliny ve žluči myší. Žluč je komplikovaným biologickým materiálem, kde největší částí objemu je voda. Z pevných látek jsou to hlavně žlučové kyseliny, hlen, žlučové pigmenty (konjugovaný bilirubin), neesterifikovaný cholesterol, mastné kyseliny a fosfolipidy (lecitin), anorganické soli, peptidové hormony a případné cizorodé látky, které vznikly detoxikací látek v játrech a byly vyloučeny do žluče [56].

Z důvodu složitosti vzorku je častým preanalytickým postupem extrakce žlučových kyselin z biologického materiálu. Na druhou stranu v analyzovaných biologických materiálech jsou žlučové kyseliny zastoupené ve velkém koncentračním rozsahu, není proto vždy zcela jasné, jestli další přítomné složky matrice budou se zkoumaným analytem interferovat. Hlavní účel extrakce žlučových kyselin a dalších preanalytických úprav je deproteinace, odsolení a delipidace biologického vzorku. K snížení vazeb žlučových kyselin na proteiny se používá zvýšení teploty, ultrasonikace a nebo přídavek hydroxidu amonného nebo sulfidu amonného. Žlučové kyseliny jsou obvykle extrahovány z biologického materiálu ethanolem, acetonitrilem nebo methanolem, dále pak méně polárními rozpouštědly jako je směs chloroform:methanol (1:1, v/v) nebo 2-propanol [6, 23].

Další často využívanou preanalytickou úpravou biologického vzorku je extrakce na pevné fázi s oktadecylovou fází. Hlavním cílem je získat roztok žlučových kyselin bez proteinů, anorganických solí a polárních organických látek, což jsou většinou meziprodukty metabolismu žlučových kyselin. Problémem u SPE metody jsou malé koncentrace ve vzorku moči, či malé množství vzorků u žluči [6, 23].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Analyzované žlučové kyseliny a vzorky

Pro optimalizaci HPLC metody s fluorescenční detekcí pro stanovení žlučových kyselin ve žluči myší byly analyzovány následující žlučové kyseliny: cholová kyselina, glykocholová kyselina, chenodeoxycholová kyselina, glykochenodeoxycholová kyselina, glykodeoxycholová kyselina, deoxycholová kyselina, α -muricholová kyselina a λ -muricholová kyselina. Standardy žlučových kyselin byly použity od firmy Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA) s minimální koncentrací 97 %.

Vybrané žlučové kyseliny byly stanovovány ve vzorcích myší žluči, které byly poskytnuty Dr. Markétou Jirouškovou z Ústavu molekulární genetiky AV ČR. Pro experimentální účely jsou myši chovány v prostředí s kontrolovanou teplotou, vlhkostí a světlem. Pro získání žluči z myši se postupuje následovně. Myš je během celého zákroku pod anestezií. Pro navození stavu bezvědomí se používá ketamin (100 mg kg^{-1}) a midazolam (5 mg kg^{-1}). Během stavu bezvědomí se do žlučovodu zavede kanyla, kterou je žluč odebírána po dobu dvou hodin každých 15 min. Získaná žluč je poté skladována v -10°C do doby analýzy [23]. Pro experimentální část této práce byly použity dva rozdílné vzorky žlučí 12 týdnů starých myší. Jeden vzorek označený „CDME treated žluč“ pocházel z myši, která byla podrobena dietě bohaté na CDME a druhý vzorek označený „untreated žluč“ pocházel z myši s dietou bez CDME. Zkratkou CDME se označuje dimethylester-L-cystinu, který je předmětem studie pro svůj kladný vliv na léčbu cystinurie, což je porucha vstřebávání cystinu v proximálním tubulu [57].

3.2 Použité chemikálie

Všechny použité chemikálie byly analytické čistoty (nebo vyšší): aceton (Lachner), acetonitril (Honeywell Riedel-de Haën), 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonát (Sigma-Aldrich), 2-bromo-2-acetonaftalen (Sigma-Aldrich), 2-bromoacetyl-6-methoxynaftalen (Acros organics), 3-[4-(bromomethyl)fenyl]-7-(diethylamino) kumarin (Sigma-Aldrich), citran draselný monohydrát (Sigma-Aldrich), 18-crown-6 (Fluka), *N,N*-diisopropylethylamin (Sigma-Aldrich), dimethylsulfoxid (Macron), hydrogenuhlíčan draselný (Lachner), kyselina chlorovodíková 35% (Lachner), methanol (Sigma-Aldrich), mravenčan amonný (Sigma-Aldrich), síran amonný (Lachema n.p. Brno), tetrakis(decyl)ammonium bromid (Sigma-Aldrich), tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich).

3.3 Použité přístroje

Navazování pevných látek bylo provedeno na analytických vahách Sartorius R 200 D. Pro měření pH mobilních fází byl použit pH-metr 3510 Jenway (kalibrace na standardní pufrů o pH = 4,01; 7,01; a 10,1). Vzorky byly centrifugovány v centrifuze Eppendorf AG – minispin. K zahřívání derivatizační směsi byla používána bloková lázeň Polar–Grand QBD2, stejně jako k odpařování rozpouštědel při přípravě vzorků. Pro ověření excitačních a emisních vlnových délek fluorescenčně derivatizovaných žlučových kyselin byl použit luminiscenční spektrofluorimetr Aminco Bowman Series 2 řízený programem AB2 ver. 5.50 (obě Thermo Spectronic), k měření byla použita křemenná kyveta s vnitřními rozměry 1×1 cm v pravoúhlém uspořádání.

Měření technikou HPLC-FLD bylo provedeno na kapalinovém chromatografu Nexera XR (Shimadzu), který se skládal z odvzdušňovače mobilní fáze DGU-20A 3R, gradientové pumpy LC-20AD XR, autosampleru SIL-20A XR, komory na kolonu CTO-20A, detektoru s diodovým polem SPD-M20A, fluorescenčního detektoru RF-20A a řídicí jednotky CBM-20A. Sestava byla řízena softwarem LabSolution 2016 (LabSolution LLC, USA).

3.4 Pracovní postupy a vyhodnocení použitých metod

3.4.1 Derivatizace žlučových kyselin 2-(bromoacetyl)-6-methoxynaftalenem

Použité roztoky

- roztok tetrakis(decyl)ammonium bromidu (TDeABr) o koncentraci 10 mmol dm^{-3} ve fosfátovém pufru o koncentraci 100 mmol dm^{-3} a o $\text{pH} = 7,0$
- roztok 2-bromoacetyl-6-methoxynaftalenu (Br-AMN) o koncentraci $2,1 \text{ mg cm}^{-3}$ v acetonu
- zásobní roztoky standardů žlučových kyselin (cholová kyselina a glykocholová kyselina) o koncentraci 1 mmol dm^{-3} v methanolu; kalibrační roztoky o nižší koncentraci byly připraveny přesným ředěním zásobního roztoku žlučové kyseliny směsí methanol:destilovaná voda (1:9, v/v)

Provedení derivatizační reakce

Derivatizační směs obsahovala vždy 300 μl roztoku TDeABr, 200 μl roztoku žlučové kyseliny o příslušné koncentraci a 50 μl roztoku Br-AMN. Směs v mikrozkuhavce podle Eppendorfa byla vložena do ultrazvukové lázně na 10 minut při 40°C . Poté byla směs 10 min centrifugována při 1000g a supernatant byl analyzován na HPLC-FLD.

HPLC analýza

Roztoky po derivatizaci byly analyzovány HPLC metodou s fluorescenčním detektorem. Separace proběhla na koloně Supercosil LC-18 ($250 \times 4,6 \text{ mm}$; $5 \mu\text{m}$) chráněné předkolonkou Superguard LC-18 (2 cm), kolonový prostor byl temperován na teplotu 35°C . Byl použit binární koncentrační gradient, jehož složka A byla destilovaná voda a složka B směs acetonitril:metanol (60:40, v/v). Koncentrační gradient je popsán v tabulce 3.1. Průtok mobilní fáze byl $1,5 \text{ ml min}^{-1}$. Nástřik vzorku na kolonu byl 50 μl . Fluorescenční detektor pracoval při vlnových délkách $\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$.

Tabulka 3.1

Koncentrační gradient pro analýzu žlučových kyselin po jejich derivatizaci 2-(bromoacetyl)-6-methoxy-naftalenem na koloně Supercosil LC-18 (250×4,6 mm; 5 µm). Složka A – destilovaná voda, složka B – směs acetonitril:methanol (60:40, v/v).

<i>t</i> min	podíl A %	podíl B %
0,0	55,0	45,0
20,0	55,0	45,0
30,0	30,0	70,0
55,0	30,0	70,0
60,0	55,0	45,0

3.4.2 Derivatizace žlučových kyselin 3-[4-(bromomethyl)fenyl]-7-(diethylamino)-kumarinem

Použité roztoky

- 0,2% roztok 3-[4-(bromomethyl)fenyl]-7-(diethylamino)kumarinu (MPAC-Br) v acetonitrilu
- 0,4% roztok 18-crownu-6 v acetonitrilu, saturovaném hydrogenuhličitanem draselným
- TRIS pufr o koncentraci 20 mmol dm⁻³ (pH = 7,5) byl připraven z 20 mmol dm⁻³ vodného roztoku tris(hydroxymethyl)aminomethanu titrací koncentrovanou octovou kyselinou na požadované pH
- zásobní roztoky standardů žlučových kyselin (cholová kyselina a glykocholová kyselina) o koncentraci 1 mmol dm⁻³ v methanolu; kalibrační roztoky o nižší koncentraci byly připraveny přesným ředěním zásobního roztoku žlučové kyseliny směsí methanolem

Provedení derivatizační reakce

Derivatizační směs obsahovala vždy 100 µl roztoku žlučové kyseliny o příslušné koncentraci, 150 µl roztoku MPAC-Br a 150 µl roztoku 18-crownu-6. Směs v mikrozkuhavce podle Eppendorfa byla vložena blokové lázni a zahřívána 20 minut při teplotě 60 °C. Poté byla směs 10 min centrifugována při 1000g a supernatant byl analyzován na HPLC-FLD.

HPLC analýza

Roztoky po derivatizaci byly analyzovány HPLC metodou s fluorescenčním detektorem. Separace proběhla na koloně Supercosil LC-18 (250×4,6 mm; 5 μm) chráněné předkolonkou Superguard LC-18 (2 cm), kolonový prostor byl temperován na teplotu 25 °C. Byl použit binární koncentrační gradient, jehož složkou A byl TRIS pufr o koncentraci 20 mmol dm⁻³ (pH = 7,5) a složkou B methanol. Koncentrační gradient je popsán v tabulce 3.2. Průtok mobilní fáze byl 1,0 ml min⁻¹. Nástřik vzorku na kolonu byl 2 μl. Fluorescenční detektor pracoval při vlnových délkách $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 475 \text{ nm}$.

Tabulka 3.2

Koncentrační gradient pro analýzu žlučových kyselin po jejich derivatizaci 3-[4-(bromomethyl)fenyl]-7-(diethylamino)kumarinem na koloně Supercosil LC-18 (250×4,6 mm; 5 μm). Složka A – 20 mmol dm⁻³ TRIS pufr, složka B – methanol.

<i>t</i> min	podíl A %	podíl B %
0,0	22,0	78,0
10,0	22,0	78,0
25,0	18,7	81,3
35,0	11,5	88,5
45,0	2,5	97,5
50,0	0,0	100,0
52,0	22,0	78,0
60,0	22,0	78,0

3.4.3 *Derivatizace žlučových kyselin 2-bromo-2-acetonaftalenem a N,N-diisopropylethylaminem*

Použité roztoky

- roztok 2-bromo-2-acetonaftalenu (Br-AMN) o koncentraci 1 mmol dm^{-3} v acetonitrilu
- roztok *N,N*-diisopropylethylaminu o koncentraci 1 mmol dm^{-3} v acetonitrilu
- zásobní roztoky standardů žlučových kyselin (cholová kyselina a glykocholová kyselina) o koncentraci 1 mmol dm^{-3} v methanolu; kalibrační roztoky o nižší koncentraci byly připraveny přesným ředěním zásobního roztoku žlučové kyseliny směsí methanolem

Provedení derivatizační reakce

K derivatizaci bylo odměřeno 20 μl roztoku žlučové kyseliny o příslušné koncentraci do mikrozkušavky podle Eppendorfa a roztok byl odpařen do sucha. Poté bylo k odparku ve zkumavce přidáno 30 μl 50% methanolu, 130 μl roztoku Br-AMN a 260 μl roztoku *N,N*-diisopropylethylaminu. Směs byla vložena do blokové lázně a zahřívána 20 minut při teplotě 60 °C. Poté byla směs odpařena do sucha ve vakuové odparce a obsah byl rozpuštěn ve 100 μl 30% acetonitrilu a vzniklý roztok analyzován na HPLC-FLD.

HPLC analýza

Roztoky po derivatizaci byly analyzovány HPLC metodou s fluorescenčním detektorem. Separace proběhla na koloně Supercosil LC-18 (250×4,6 mm; 5 μm) chráněné předkolonkou Superguard LC-18 (2 cm), kolonový prostor byl temperován na teplotu 50 °C. Byl použit binární koncentrační gradient, jehož složkou A byl acetonitril a složkou B destilovaná voda. Koncentrační gradient je popsán v tabulce 3.3. Průtok mobilní fáze byl $0,8 \text{ ml min}^{-1}$. Nástřik vzorku na kolonu byl 50 μl . Fluorescenční detektor pracoval při vlnových délkách $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 475 \text{ nm}$.

Tabulka 3.3

Koncentrační gradient pro analýzu žlučových kyselin po jejich derivatizaci 2-bromo-2-acetonaftalenem a *N,N*-diisopropylethylaminem na koloně Supercosil LC-18 (250×4,6 mm; 5 μm). Složka A – acetonitril, složka B – destilovaná voda.

<i>t</i> min	podíl A %	podíl B %
0,00	30,0	70,0
15,00	85,0	15,0
17,01	85,0	15,0
25,00	30,0	70,0

3.4.4 Derivatizace žlučových kyselin 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonátem

Použité roztoky

- roztok 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonátu (BDETS) o koncentraci 1 mmol dm⁻³ v acetonitrilu
- roztok mravenčanu amonného o koncentraci 40 mmol dm⁻³ v destilované vodě s pH upraveným na hodnotu 3,56
- zásobní roztoky standardů žlučových kyselin (cholová kyselina, glykocholová kyselina, chenodeoxycholová kyselina, ursodeoxycholová kyselina, glykochenodeoxycholová kyselina, glykodeoxycholová kyselina, deoxycholová kyselina, α-muricholová kyselina a λ-muricholová kyselina) o koncentraci 1 mmol dm⁻³ v methanolu; kalibrační roztoky o nižší koncentraci byly připraveny přesným ředěním zásobního roztoku žlučové kyseliny směsí acetonitrilem

Příprava vzorků biologického materiálu

Do mikrozkuřavky podle Eppendorfa bylo odpipetováno 40 μl myší žluči a přidáno 100 μl methanolu. Ke směsi bylo přidáno 20 mg síranu amonného a směs byla intenzivně třepána 5 minut. Následně byla směs centrifugována po dobu 10 minut při 13000g. Supernatant byl odebrán a odpařen ve vyhřívacím bloku do sucha, odparek byl rozpuštěn ve 40 μl methanolu za intenzivního třepání po dobu 10 minut.

Jako interní standard byla použita chenodeoxycholová kyselina o výsledné koncentraci 2×10⁻⁵ mol dm⁻³, která se v žádném vzorku žluči nevyskytovala.

Provedení derivatizační reakce

Derivatizační směs obsahovala vždy 40 µl roztoku žlučové kyseliny o příslušné koncentraci, resp. připraveného roztoku ze vzorku biologického materiálu (viz výše), 500 mg monohydrátu citranu draselného, 100 µl dimethylsulfoxidu a 150 µl roztoku BDETS. Směs v mikrozkuhavce podle Eppendorfa byla vložena do blokové lázně a zahřívána 30 minut při teplotě 95 °C. Poté byla směs 10 min centrifugována při 13000g. Supernatant byl odebrán, zředěn 100 µl destilované vody a analyzován na HPLC-FLD.

HPLC analýza

Roztoky po derivatizaci byly analyzovány HPLC metodou s fluorescenčním detektorem. Separace proběhla na koloně Supercosil LC-18 (250×4,6 mm; 5 µm) chráněné předkolonkou Superguard LC-18 (2 cm), kolonový prostor byl temperován na teplotu 30 °C. Byl použit binární koncentrační gradient, jehož složkou A byl acetonitril a složkou B směs roztoku mravenčanu amonného o koncentraci 40 mmol dm⁻³ (pH = 3,56):acetonitril (50:50, v/v). Koncentrační gradient je popsán v tabulce 3.4. Průtok mobilní fáze byl 1,0 ml min⁻¹. Nástřik vzorku na kolonu byl 25 µl. Fluorescenční detektor pracoval při vlnových délkách $\lambda_{\text{ex}} = 333 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 390 \text{ nm}$.

Tabulka 3.4

Koncentrační gradient pro analýzu žlučových kyselin po jejich derivatizaci 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonátem na koloně Supercosil LC-18 (250×4,6 mm; 5 µm). Složka A – acetonitril, složka B – směs roztoku mravenčanu amonného o koncentraci 40 mmol dm⁻³ (pH = 3,56):acetonitril (50:50, v/v).

<i>t</i> min	podíl A %	podíl B %
0,0	0,0	100,0
37,5	70,0	30,0
55,0	100,0	0,0
56,0	100,0	0,0
60,0	0,0	100,0

3.5 Statistické zpracování naměřených hodnot

Všechna měření byla prováděna třikrát, výsledky jsou uváděny jako mediány naměřených hodnot. Statistické zpracování bylo provedeno běžnými statistickými postupy na hladině významnosti 0,95 (cit. [58]). Data byla testována pomocí Deanova-Dixonova testu. Výpočty retenčních faktorů, počtu teoretických pater, asymetrie píku byly provedeny podle [59].

Ovládání HPLC systému, sběr dat, automatické integrování píků a následné vyhodnocení bylo zajištěno osobním počítačem se softwarovým programem LabSolution 2016 (Labsolution LLC, USA). Grafy, výpočty a chemické vzorce zpracovávány pomocí softwarových programů OriginPro 6.0 (Microcal Software, USA), Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA), a Chemdraw Ultra 8.0 (CambridgeSoft Corporation, USA).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

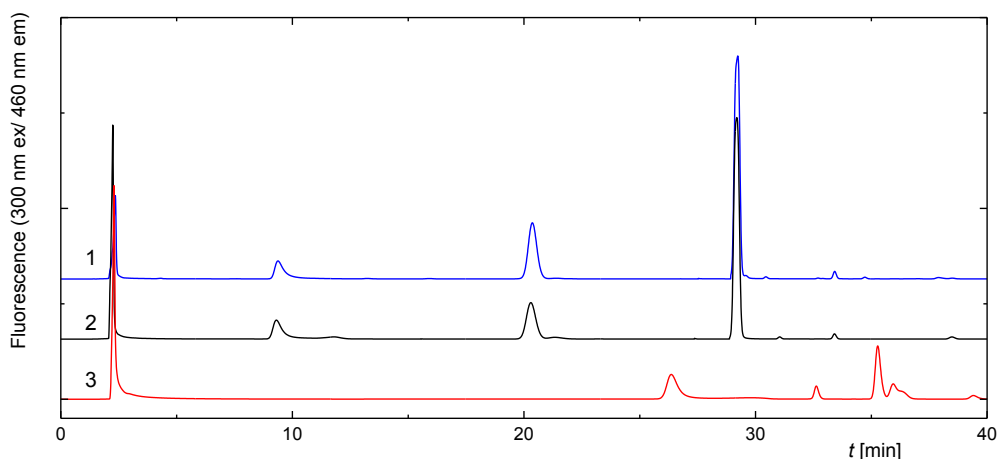
Na základě literatury [6, 44, 45] byly vybrány čtyři různé derivatizační reakce pro přípravu fluorescenčně aktivních derivátů žlučových kyselin. Produkty derivatizačních reakcí byly následně analyzovány HPLC metodou s fluorescenční detekcí. Po výběru vhodné derivatizační reakce byly optimalizovány podmínky HPLC-FLD separace a následně stanoveny žlučové kyseliny v biologickém materiálu.

4.1 Volba derivatizační reakce

4.1.1 *Derivatizace žlučových kyselin 2-(bromoacetyl)-6-methoxynaftalenem*

Derivatizace žlučových kyselin pomocí 2-(bromoacetyl)-6-methoxynaftalenu, navržená Gatti et al. [44], byla studována u cholové a glykocholové kyseliny. Derivatizační reakce nebyla úspěšná ani u jedné vybrané žlučové kyseliny. Na obr. 4.1 je HPLC-FLD chromatogram produktů derivatizace obou žlučových kyselin v porovnání se slepým vzorkem, který obsahoval jen derivatizační činidlo. Na chromatogramech produktů derivatizace jsou patrné tři píky s retenčními časy $t_{r,1} = 9,40$ min, $t_{r,2} = 20,30$ min a $t_{r,3} = 29,10$ min, které jsou pro obě dvě žlučové kyseliny totožné, tudíž není možné identifikovat jednotlivé žlučové kyseliny podle retenčních časů, a následně je stanovit.

Přítomnost tří totožných píků u studovaných žlučových kyselin může být zapříčiněna vznikem stejných produktů po derivatizační reakci. Druhým možným vysvětlením je, že sice došlo k derivatizaci příslušné žlučové kyseliny, ale produkty derivatizační reakce nejsou stabilní a rozpadají se na tři stejné produkty.

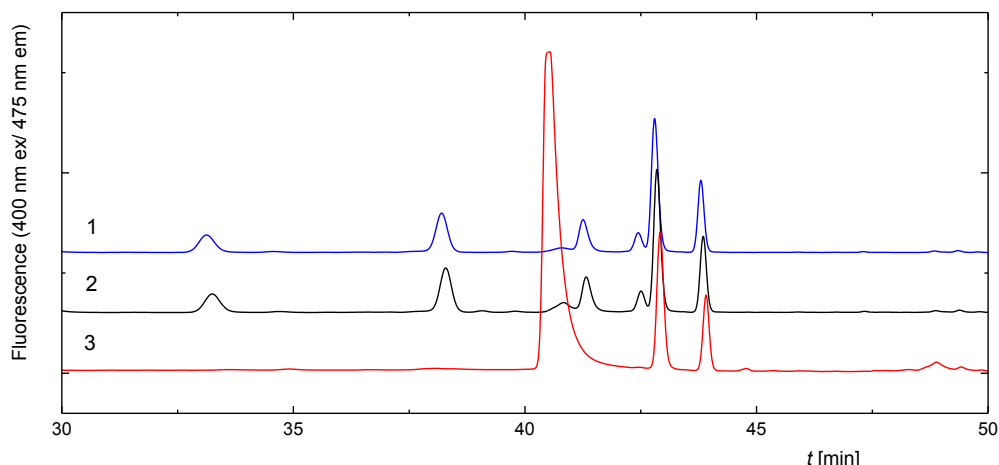


Obr. 4.1 HPLC-FLD chromatogram produktů derivatizace žlučových kyselin 2-(bromoacetyl)-6-methoxy-naftalenem: (1) standard cholové kyseliny ($c = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), (2) standard glykocholové kyseliny ($c = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), (3) slepý vzorek derivatizačního činidla. Podmínky separace: kolona Supercosil LC-18 (250×4,6 mm; 5 μm) chráněná předkolonkou Superguard LC-18 (2 cm), binární gradient (složka A acetonitril, složka B acetonitril:methanol (60:40, v/v) gradientový program tab. 3.1), průtok mobilní fáze $1,5 \text{ ml min}^{-1}$, teplota kolony 35°C , fluorescenční detektor $\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$.

4.1.2 Derivatizace žlučových kyselin 3-[4-(bromomethyl)fenyl]-7-(diethylamino)-kumarinem

Derivatizace žlučových kyselin pomocí 3-[4-(bromomethyl)fenyl]-7-(diethylamino)-kumarinu, navržená Kurosawou et al. [45], byla studována u cholové a glykocholové kyseliny. Derivatizační reakce nebyla úspěšná ani u jedné vybrané žlučové kyseliny. Na obr. 4.2 je HPLC-FLD chromatogram produktů derivatizace obou žlučových kyselin v porovnání se slepým vzorkem, který obsahoval jen derivatizační činidlo. Na chromatogramech produktů derivatizace jsou patrné čtyři píky s retenčními časy $t_{r,1} = 33,00 \text{ min}$, $t_{r,2} = 38,20 \text{ min}$, $t_{r,3} = 41,20 \text{ min}$, $t_{r,4} = 42,50 \text{ min}$, které jsou pro obě dvě žlučové kyseliny totožné, tudíž není možné identifikovat jednotlivé žlučové kyseliny a posléze je ani stanovit.

Přítomnost čtyř totožných píků u studovaných žlučových kyselin může být zapříčiněna vznikem stejných produktů po derivatizační reakci. Druhým možným vysvětlením je, že sice došlo k derivatizaci příslušné žlučové kyseliny, ale produkty derivatizační reakce nejsou stabilní a rozpadají se na čtyři stejné produkty.

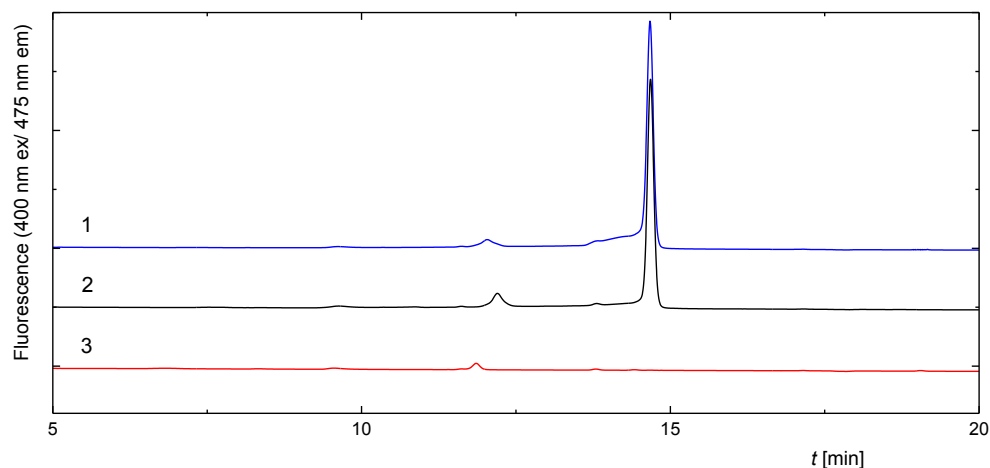


Obr. 4.2 HPLC-FLD chromatogram produktů derivatizace žlučových kyselin 3-[4-(bromomethyl)fenyl]-7-(diethylamino)kumarinem: (1) standard cholové kyseliny ($c = 0,75 \text{ mmol dm}^{-3}$), (2) standard glykocholové kyseliny ($c = 0,75 \text{ mmol dm}^{-3}$), (3) slepý vzorek derivatizačního činidla. Podmínky separace: kolona Supercosil LC-18 ($250 \times 4,6 \text{ mm}$; $5 \text{ }\mu\text{m}$) chráněná předkolonkou Superguard LC-18 (2 cm), binární gradient (složka A TRIS pufr o koncentraci 20 mmol dm^{-3} ($\text{pH} = 7,5$), složka B methanol, gradientový program tab. 3.2), průtok mobilní fáze $1,0 \text{ ml min}^{-1}$, teplota kolony $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, fluorescenční detektor $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 475 \text{ nm}$.

4.1.3 Derivatizace žlučových kyselin 2-bromo-2-acetonaftalenem a *N,N*-diisopropylethylaminem

Derivatizace žlučových kyselin pomocí 2-bromo-2-acetonaftalenu a *N,N*-diisopropylethylaminu (podle kap. 2.2.2), byla studována u cholové a glykocholové kyseliny. Derivatizační reakce nebyla úspěšná ani u jedné vybrané žlučové kyseliny. Na obr. 4.3 je HPLC-FLD chromatogram produktů derivatizace obou žlučových kyselin v porovnání se slepým vzorkem, který obsahoval jen derivatizační činidlo. Na chromatogramech produktů derivatizace je patrný pík s retenčním časem $t_r = 14,90 \text{ min}$, který je pro obě dvě žlučové kyseliny stejný, tudíž není možné identifikovat jednotlivé žlučové kyseliny a posléze je stanovit.

Přítomnost píku u studovaných žlučových kyselin může být zapříčiněna vznikem stejného produktu po derivatizační reakci.



Obr. 4.3 HPLC-FLD chromatogram produktů derivatizace žlučových kyselin 2-bromo-2-acetonaftalenem a *N,N*-diisopropylethylaminem: (1) standard cholové kyseliny ($c = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$), (2) standard glykocholové kyseliny ($c = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$), (3) slepý vzorek derivatizačního činidla. Podmínky separace: kolona Supercosil LC-18 ($250 \times 4,6 \text{ mm}$; $5 \text{ }\mu\text{m}$) chráněná předkolonkou Superguard LC-18 (2 cm), binární gradient (složka A acetonitril, složka B destilovaná voda, gradientový program tab. 3.3), průtok mobilní fáze $0,8 \text{ ml min}^{-1}$, teplota kolony $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$, fluorescenční detektor $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 475 \text{ nm}$.

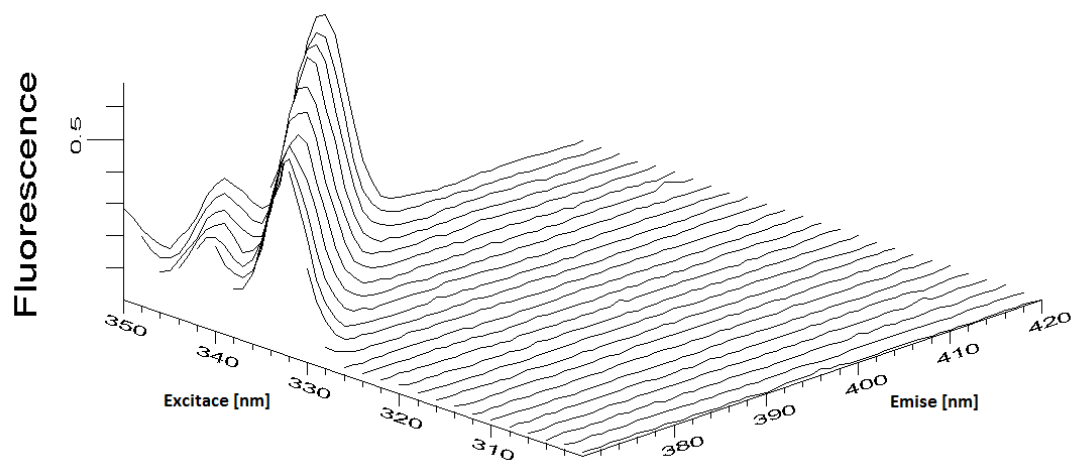
4.1.4 Derivatizace žlučových kyselin 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonátem

Derivatizace žlučových kyselin pomocí 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonátu, navržená Jinmao et al. [6], byla studována u cholové, glykocholové, cheno-deoxycholové, deoxycholové, glykochenodeoxycholové, glykodeoxycholové, α -muri-cholové a λ -muricholové kyseliny. Derivatizační reakce byla úspěšná u všech osmi žlučových kyselin (viz kap. 4.3), proto byla použita pro vypracování HPLC-FLD metody pro jejich stanovení ve žluči myší.

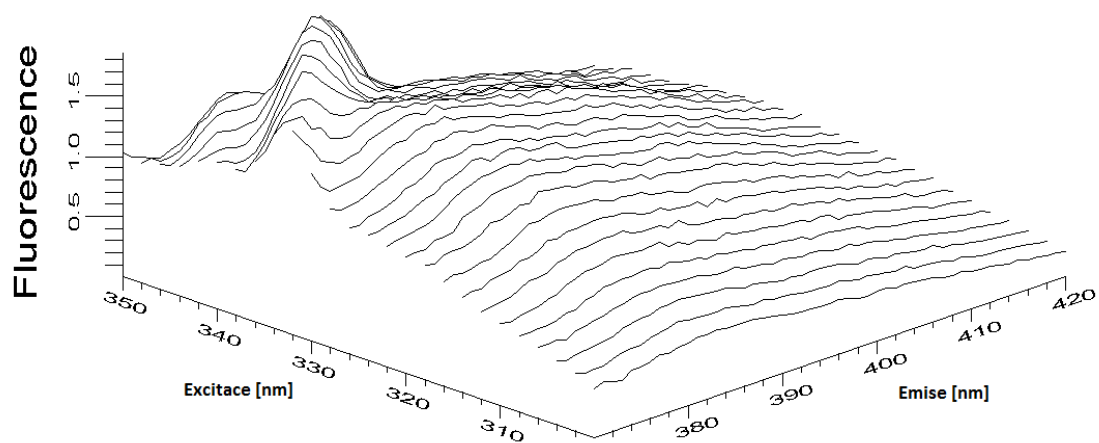
4.2 Proměření fluorescenčního spektra 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonátu

Pro derivatizaci žlučových kyselin a následnou separaci byla na základě výsledků ověření reakcí (kap. 4.1) vybrána metoda derivatizace žlučových kyselin reakcí žlučových kyselin s 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonátem. Před vlastní optimalizací HPLC separace produktů derivatizace žlučových kyselin bylo pro zjištění vhodných excitačních a emisních vlnových délek fluorescenční detekce proměřeno fluorescenční spektrum derivatizačního činidla 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonátu v prostředí složky A mobilní fáze (acetonitril) i v prostředí složky B mobilní fáze (směs roztoku mravenčanu amonného o koncentraci 40 mmol dm^{-3} (pH = 3,56):acetonitril (50:50, v/v)). Naměřená spektra jsou uvedena na obr. 4.4–4.5.

Pro detekci produktů derivatizace žlučových kyselin reakcí s 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonátem byly na základě proměřených fluorescenčních spekter použity vlnové délky pro excitaci $\lambda = 333 \text{ nm}$ a pro emisi $\lambda = 390 \text{ nm}$, jelikož bylo nutné zohlednit fluorescenci jak složky A mobilní fáze, tak složky B mobilní fáze.

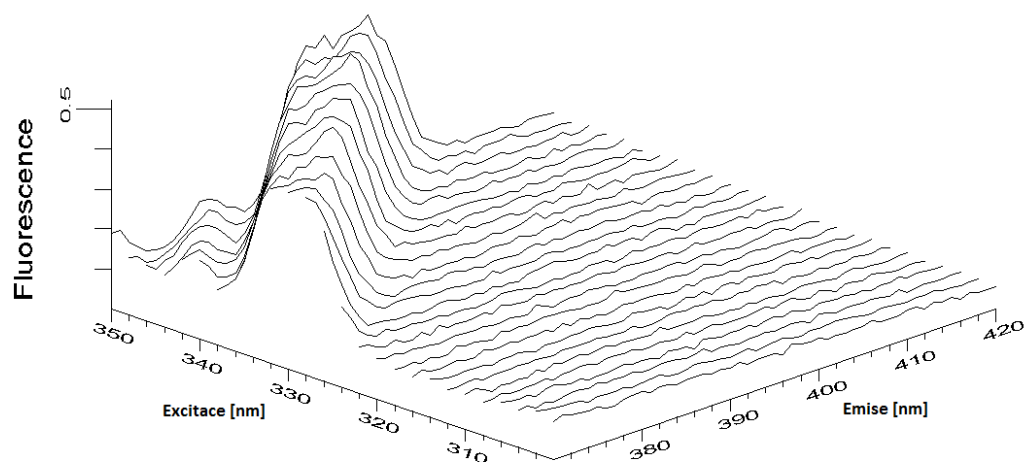


(a)

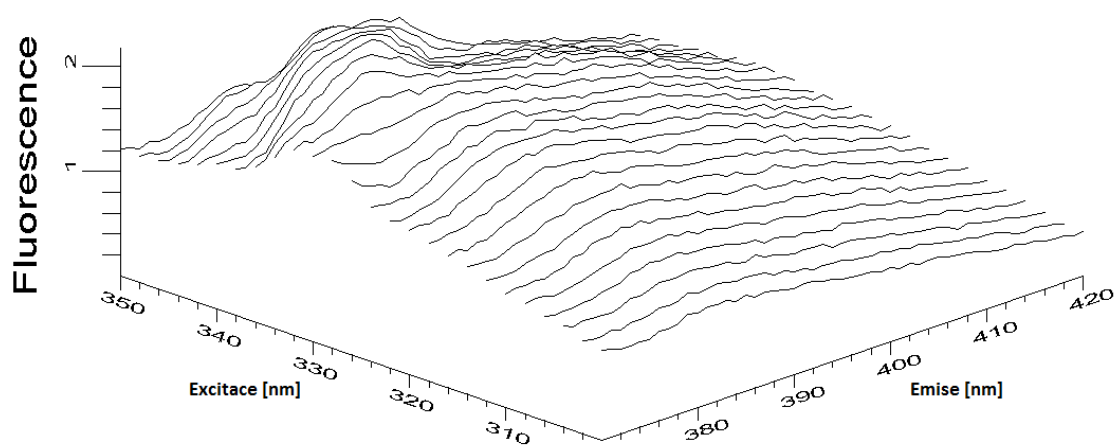


(b)

Obr. 4.4 Závislost relativní fluorescence na vlnových délkách excitace, resp. emise pro (a) složku A mobilní fáze (acetonitril) a (b) roztok 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonátu ($c = 3 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) v prostředí složky A mobilní fáze.



(a)



(b)

Obr. 4.5 Závislost relativní fluorescence na vlnových délkách excitace, resp. emise pro (a) složku B mobilní fáze (roztok mravenčanu amonného o koncentraci 40 mmol dm^{-3} ($\text{pH} = 3,56$):acetonitrilu (50:50, v/v)) a (b) roztok 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonátu ($c = 3 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) v prostředí složky B mobilní fáze.

4.3 Optimalizace chromatografických podmínek pro stanovení žlučových kyselin po derivatizaci 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonátu

4.3.1 Optimalizace gradientu mobilní fáze

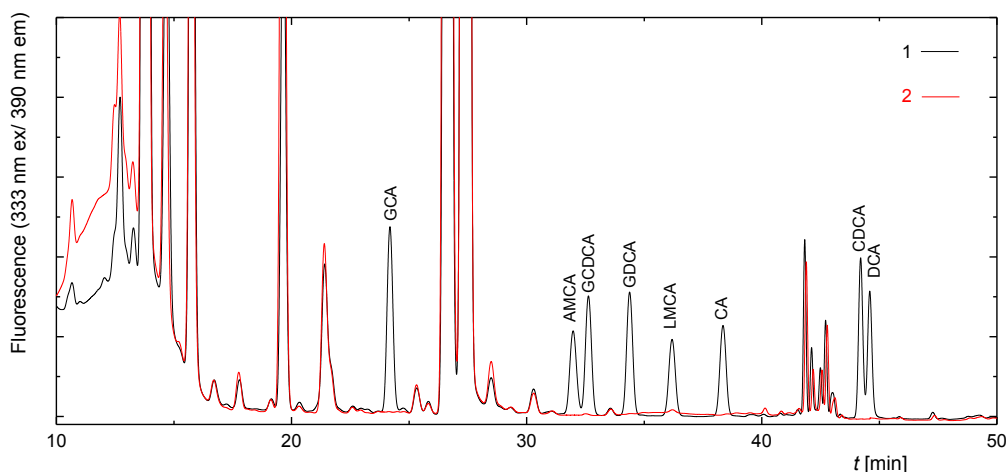
Na základě literatury [6] byla pro separaci derivatizovaných žlučových kyselin reakcí s 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonátem použita jako stacionární fáze kolona Supercosil LC-18 (250×4,6 mm; 5 μm) chráněná předkolonkou Superguard LC-18 (2 cm) a binární koncentrační gradientová eluce, jejíž složkou A byl acetonitril a složkou B směs mravenčanu amonného o koncentraci 40 mmol dm⁻³ (pH = 3,56):acetonitril (50:50, v/v).

Nejprve byl použit gradientový program převzatý z literatury [6], uvedený v tab. 4.1 jako gradient 1. Při jeho použití se však ukázalo, že dvě dvojice žlučových kyselin (α-muricholová a glykochenodeoxycholová, resp. chenodeoxycholová a deoxycholová) mají špatné rozlišení (obr. 4.6). Bylo proto přistoupeno k optimalizaci gradientové eluce. Bylo navrženo a otestováno pět různých gradientů, kde byl měněn časový průběh objemového poklesu mobilní fáze složky B; průběh jednotlivých gradientů je popsán v tabulce 4.1. Byly sledovány chromatografické parametry uvedených dvou dvojic žlučových kyselin (tab. 4.2-4.3), které ukázaly, že optimálním testovaným gradientem je gradient 6. Na obr. 4.7 je znázorněn HPLC-FLD chromatogram směsi derivatizovaných všech osmi studovaných žlučových kyselin při použití gradientu 6, detailní rozlišení obou dvou výše zmíněných dvojic je uvedeno na obr. 4.8. Z chromatogramu je zřejmé, že píky α-muricholové kyseliny a glykochenodeoxycholové a dále chenodeoxycholové kyseliny a deoxycholové byly od sebe separovány na základní linii s rozlišením $R_{1,2} \geq 1,5$. Pro další postup studie byl použit gradient 6.

Tabulka 4.1

Přehled studovaných koncentračních gradientů pro analýzu žlučových kyselin po jejich derivatizaci 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonátem na koloně Supercosil LC-18 (250×4,6 mm; 5 μm). Složka A – acetonitril, složka B – směs roztoku mravenčanu amonného o koncentraci 40 mmol dm⁻³ (pH = 3,56):acetonitril (50:50, v/v).

objem B %	<i>t</i> min					
	gradient 1	gradient 2	gradient 3	gradient 4	gradient 5	gradient 6
100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
30	35,0	35,0	35,0	35,0	36,0	37,5
0	50,0	38,0	53,0	54,0	55,0	55,0
0	55,0	55,0	55,0	55,0	56,0	56,0
100	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0



Obr. 4.6 HPLC-FLD chromatogram produktů derivatizace žlučových kyselin 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonátem: (1) směs standardů žlučových kyselin (každá o koncentraci 4×10^{-5} mol dm⁻³), identifikace píků: GCA glykocholová kyselina ($t_r = 25,10$ min), AMCA α -muricholová kyselina ($t_r = 31,80$ min), GCDCA glykochenodeoxycholová kyselina ($t_r = 32,50$ min), GDCA glykodeoxycholová kyselina ($t_r = 34,30$ min), LMCA λ -muricholová kyselina ($t_r = 36,10$ min), CA cholová kyselina ($t_r = 38,20$ min), CDCA chenodeoxycholová kyselina ($t_r = 44,10$ min), DCA deoxycholová kyselina ($t_r = 44,50$ min); (2) slepý vzorek derivatizačního činidla. Podmínky separace: kolona Supercosil LC-18 (250×4,6 mm; 5 μm) chráněná předkolonkou Superguard LC-18 (2 cm), binární gradient (složka A acetonitril, B směs roztoku mravenčanu amonného o koncentraci 40 mmol dm⁻³ (pH = 3,56):acetonitril (50:50, v/v), gradientový program 1 z tab. 4.1), průtok mobilní fáze 1,0 ml min⁻¹, teplota kolony 30 °C, fluorescenční detektor $\lambda_{ex} = 333$ nm, $\lambda_{em} = 390$ nm.

Tabulka 4.2

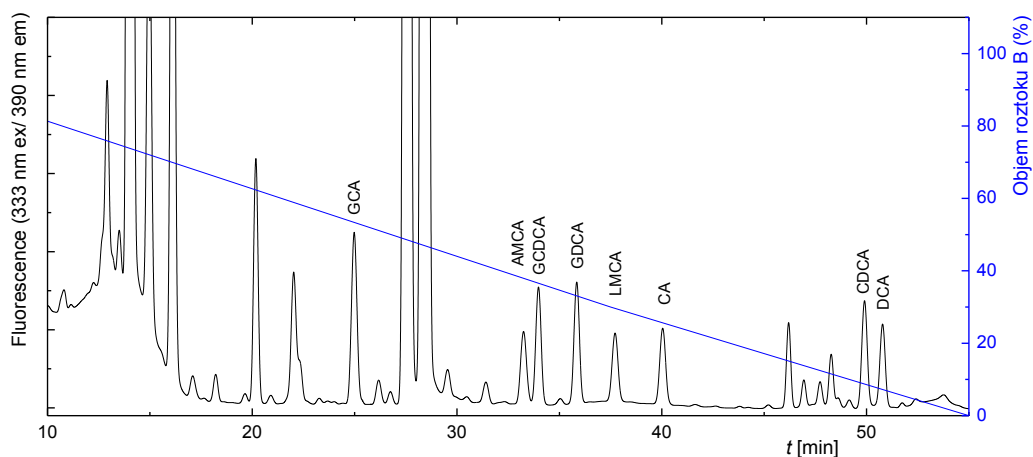
Vliv typu gradientu mobilní fáze (definován v tab. 4.1) na rozlišení píků chenodeoxycholové kyseliny ($t_{r,1}$) a deoxycholové kyseliny ($t_{r,2}$) při HPLC-FLD analýze po jejich derivatizaci 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonátem na koloně Supercosil LC-18 (250×4,6 mm; 5 μm). Průtok mobilní fáze 1,0 ml min⁻¹, teplota kolony 30 °C, fluorescenční detektor λ_{ex} = 333 nm, λ_{em} = 390 nm.

gradient	$t_{r,1}$ min	$t_{r,2}$ min	$R_{1,2}$
1	44,20	44,59	1,10
2	43,45	43,76	1,07
3	47,81	48,67	1,64
4	47,96	48,85	1,59
5	48,82	49,74	1,70
6	49,90	50,79	1,76

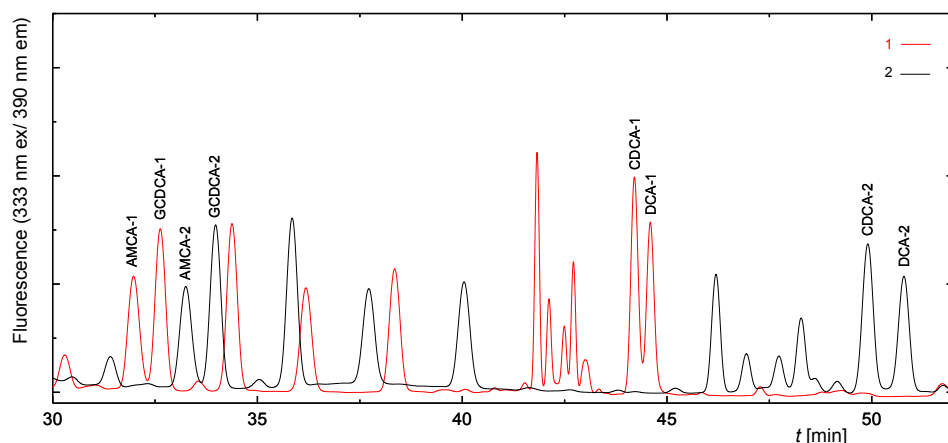
Tabulka 4.3

Vliv typu gradientu mobilní fáze (definován v tab. 4.1) na rozlišení píků α -muricholové kyseliny ($t_{r,1}$) a glykochenodeoxycholové kyseliny ($t_{r,2}$) při HPLC-FLD analýze po jejich derivatizaci 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonátem na koloně Supercosil LC-18 (250×4,6 mm; 5 μm). Průtok mobilní fáze 1,0 ml min⁻¹, teplota kolony 30 °C, fluorescenční detektor λ_{ex} = 333 nm, λ_{em} = 390 nm.

gradient	$t_{r,1}$ min	$t_{r,2}$ min	$R_{1,2}$
1	31,98	32,63	1,11
2	31,96	32,62	1,26
3	31,97	32,62	1,20
4	31,95	32,60	1,22
5	32,49	33,17	1,28
6	33,25	33,98	1,51



Obr. 4.7 HPLC-FLD chromatogram produktů derivatizace žlučových kyselin 1,2-benzo-3,4-dihydro-karbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonátem: (1) směs standardů žlučových kyselin (každá o koncentraci $4 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), identifikace píků: GCA glykocholová kyselina ($t_r = 25,10 \text{ min}$), AMCA α -muricholová kyselina ($t_r = 33,30 \text{ min}$), GCDCA glykochenodeoxycholová kyselina ($t_r = 34,00 \text{ min}$), GDCA glykodeoxycholová kyselina ($t_r = 35,90 \text{ min}$), LMCA λ -muricholová kyselina ($t_r = 37,80 \text{ min}$), CA cholová kyselina ($t_r = 40,10 \text{ min}$), CDCA chenodeoxycholová kyselina ($t_r = 50,00 \text{ min}$), DCA deoxycholová kyselina ($t_r = 50,80 \text{ min}$); (2) slepý vzorek derivatizačního činidla. Podmínky separace: kolona Supercosil LC-18 (250×4,6 mm; 5 μm) chráněná předkolonkou Superguard LC-18 (2 cm), binární gradient (složka A acetonitril, B směs roztoku mravenčanu amonného o koncentraci 40 mmol dm $^{-3}$ (pH = 3,56):acetonitril (50:50, v/v), gradientový program 6 z tab. 4.1, průběh gradientu vyjádřený jako změna podílu složky B v mobilní fázi je zobrazen modrou křivkou), průtok mobilní fáze 1,0 ml min $^{-1}$, teplota kolony 30 °C, fluorescenční detektor $\lambda_{\text{ex}} = 333 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 390 \text{ nm}$.



Obr. 4.8 Porovnání HPLC-FLD chromatogramů produktů derivatizace žlučových 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonátem v závislosti na použitém gradientu mobilní fáze (definován v tab. 4.1): (1) gradient 1, (2) gradient 6. Identifikace píků: AMCA α -muricholová kyselina, GCDCA glykochenodeoxycholová kyselina, CDCA chenodeoxycholová kyselina a DCA deoxycholová kyselina. Podmínky separace: kolona Supercosil LC-18 (250×4,6 mm; 5 μ m) chráněná předkolonkou Superguard LC-18 (2 cm), binární gradient (složka A acetonitril, B směs roztoku mravenčanu amonného o koncentraci 40 mmol dm⁻³ (pH = 3,56):acetonitril (50:50, v/v). Průtok mobilní fáze 1,0 ml min⁻¹, teplota kolony 30 °C, fluorescenční detektor λ_{ex} = 333 nm, λ_{em} = 390 nm.

4.3.2 Optimalizace rychlosti průtoku mobilní fáze

Za účelem zkrácení celkové doby analýzy byla provedena optimalizace rychlosti průtoku mobilní fáze. Byly optimalizovány tři různé rychlosti průtoku mobilní fáze 1,0 ml min⁻¹, 1,1 ml min⁻¹ a 1,2 ml min⁻¹ a studován jejich vliv na chromatografické parametry píků stanovovaných žlučových kyselin. Z tabulky 4.4 je zřejmé, že z hlediska těchto faktorů (asymetrie píků a počet teoretických pater), je optimální průtok mobilní fáze 1,0 ml min⁻¹, přestože celková doba analýzy je nejdelší.

Tabulka 4.4

Vliv rychlosti průtoku mobilní fáze na parametry separace (t_r retenční čas, A_s faktor asymetrie píku a n počet teoretických pater) při HPLC-FLD analýze žlučových kyselin po jejich derivatizaci 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonátem. Podmínky separace: kolona Supercosil LC-18 (250×4,6 mm; 5 μ m) s předkolonkou Superguard LC-18 (2 cm), binární gradientová eluce (gradient 6 popsán v tabulce 4.1), teplota kolony 30 °C, fluorescenční detektor λ_{ex} = 333 nm, λ_{em} = 390 nm.

kyselina	průtok mobilní fáze / ml min ⁻¹								
	1,0			1,1			1,2		
	t_r	A_s	n	t_r	A_s	n	t_r	A_s	n
	min			min			min		
glykocholová	25,05	1,04	11429	23,98	0,93	6507	22,99	1,20	8712
α -muricholová	33,25	0,96	19548	32,00	1,97	16878	30,90	1,52	15738
glykochenodeoxycholová	34,00	1,08	23663	32,85	1,50	24420	31,72	1,14	21450
glykodeoxycholová	35,87	0,96	27399	34,71	1,35	18557	33,55	1,14	23996
λ -muricholová	37,75	1,03	24269	36,48	1,22	27290	35,24	1,21	19128
cholová	40,07	0,96	48347	38,79	1,42	47297	37,55	1,32	25846
chenodeoxycholová	49,95	1,08	49133	48,66	1,42	46740	47,43	1,42	38393
deoxycholová	50,82	0,95	50902	49,57	1,50	56747	48,36	1,50	46166

4.3.3 Opakovatelnost retenčních časů

Jelikož identifikace žlučových kyselin ve žluči myši proběhla na základě porovnání retenčních časů analytů s retenčními časy standardů, byla zjišťována opakovatelnost retenčních časů žlučových kyselin. Byl třikrát proměřen vzorek směsi všech osmi studovaných žlučových kyselin ($c = 4 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³). Podmínky analýzy vycházely z výše optimalizovaných podmínek metody, byl použit gradientový program 6 popsáný v tabulce 4.1 a optimalizovaná rychlost průtoku mobilní fáze, tj. 1,0 ml min⁻¹. V tabulce 4.5 jsou uvedeny mediány retenčních časů s intervalem spolehlivosti.

Tabulka 4.5

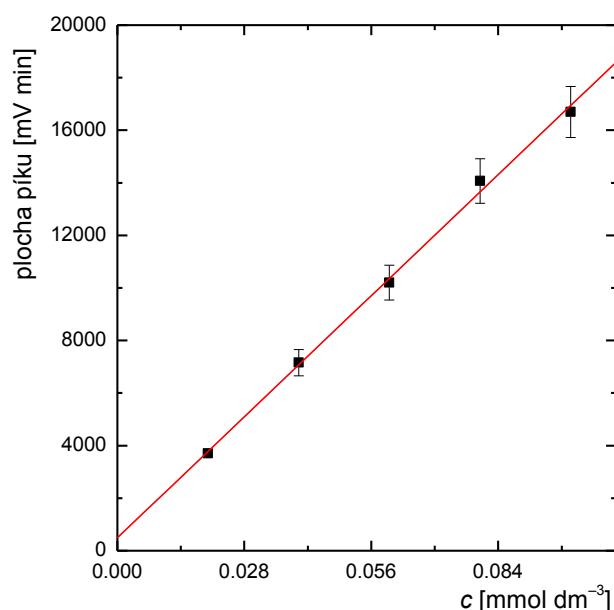
Opakovatelnost retenčních časů, vyjádřená jako jejich medián s intervalem spolehlivosti, při HPLC-FLD analýze žlučových kyselin po jejich derivatizaci 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonátem. Podmínky separace: kolona Supercosil LC-18 (250×4,6 mm; 5 μm) chráněná předkolonkou Superguard LC-18 (2 cm), binární gradient (složka A acetonitril, B směs roztoku mravenčanu amonného o koncentraci 40 mmol dm⁻³ (pH = 3,56):acetonitril (50:50, v/v), gradientový program 6 z tab. 4.1), průtok mobilní fáze 1,0 ml min⁻¹, teplota kolony 30 °C, fluorescenční detektor λ_{ex}= 333 nm, λ_{em}= 390 nm.

kyselina	<i>t_r</i> min
glykocholová	25,05 ± 0,01
α-muricholová	33,25 ± 0,09
glykochenodeoxycholová	34,0 ± 0,15
glykodeoxycholová	35,87 ± 0,03
λ-muricholová	37,75 ± 0,01
cholová	40,07 ± 0,01
chenodeoxycholová	49,95 ± 0,01
deoxycholová	50,82 ± 0,01

4.3.4 Kalibrační závislosti

Studované žlučové kyseliny byly při HPLC-FD stanovení kvantifikovány metodou kalibrační závislosti vyjádřené jako lineární regrese pětibodové kalibrace. Jako analytický signál sloužila plocha chromatografického píku. Obr. 4.9 zobrazuje příklad kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci pro cholovou kyselinu v rozmezí 1×10⁻⁵–1×10⁻⁴ mol dm⁻³.

V tabulce 4.6 jsou uvedeny změřené a vypočítané parametry kalibračních závislostí (rovnice lineární regrese, korelační koeficient, limit detekce a limit kvantifikace) pro stanovení studovaných žlučových kyselin. Limit detekce, resp. limit kvantifikace, byly vypočítány jako trojnásobek, resp. desetinásobek, šumu slepého vzorku, vztaženého na danou žlučovou kyselinu.



Obr. 4.9 Závislost plochy píku cholové kyseliny na její koncentraci při HPLC-FLD stanovení cholové kyseliny po její derivatizaci 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonátem. Podmínky separace: kolona Supercosil LC-18 (250×4,6 mm; 5 μ m) chráněná předkolonkou Superguard LC-18 (2 cm), binární gradient (složka A acetonitril, B směs roztoku mravenčanu amonného o koncentraci 40 mmol dm⁻³ (pH = 3,56):acetonitril (50:50, v/v), gradientový program 6 z tab. 4.1), průtok mobilní fáze 1,0 ml min⁻¹, teplota kolony 30 °C, fluorescenční detektor λ_{ex} = 333 nm, λ_{em} = 390 nm.

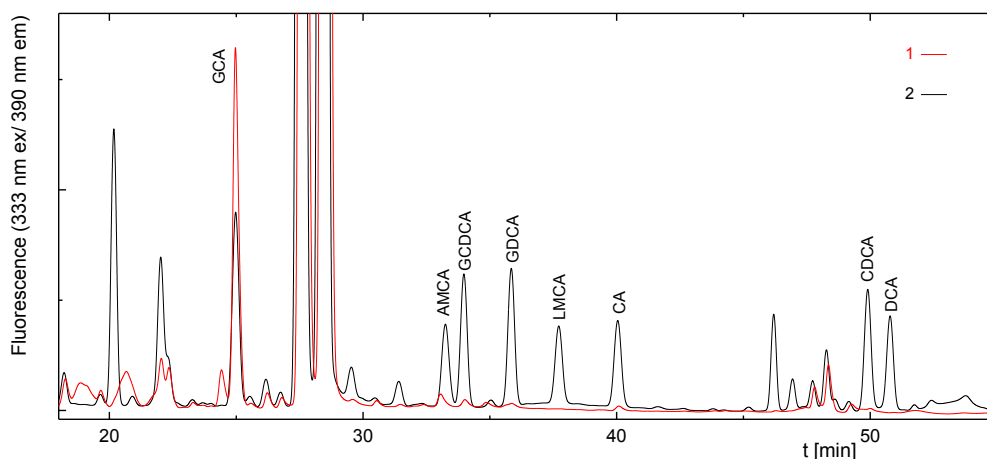
Tabulka 4.6

Parametry kalibračních závislostí (rovnice lineární regrese, korelační koeficient, limit detekce a limit kvantifikace) pro stanovení žlučových kyselin metodou HPLC-FLD po jejich derivatizaci 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonátem. Podmínky separace: kolona Supercosil LC-18 (250×4,6 mm; 5 μ m) chráněná předkolonkou Superguard LC-18 (2 cm), binární gradient (složka A acetonitril, B směs roztoku mravenčanu amonného o koncentraci 40 mmol dm⁻³ (pH = 3,56):acetonitril (50:50, v/v), gradientový program 6 z tab. 4.1), průtok mobilní fáze 1,0 ml min⁻¹, teplota kolony 30 °C, fluorescenční detektor λ_{ex} = 333 nm, λ_{em} = 390 nm.

kyselina	rovnice kalibrační závislosti	<i>R</i>	<i>LOD</i>	<i>LOQ</i>
			$\mu\text{mol dm}^{-3}$	$\mu\text{mol dm}^{-3}$
glykocholová	$A [\text{mV min}] = 228000 c [\text{mmol dm}^{-3}]$	0,9974	0,355	1,171
α -muricholová	$A [\text{mV min}] = 235000 c [\text{mmol dm}^{-3}]$	0,9983	0,538	1,775
glykochenodeoxycholová	$A [\text{mV min}] = 255000 c [\text{mmol dm}^{-3}]$	0,9978	0,486	1,605
glykodeoxycholová	$A [\text{mV min}] = 310000 c [\text{mmol dm}^{-3}]$	0,9954	0,492	1,624
λ -muricholová	$A [\text{mV min}] = 169000 c [\text{mmol dm}^{-3}]$	0,9997	0,268	0,886
cholová	$A [\text{mV min}] = 171000 c [\text{mmol dm}^{-3}]$	0,9987	0,364	1,203
chenodeoxycholová	$A [\text{mV min}] = 188000 c [\text{mmol dm}^{-3}]$	0,9964	0,326	1,077
deoxycholová	$A [\text{mV min}] = 155000 c [\text{mmol dm}^{-3}]$	0,9985	0,444	1,465

4.4 Stanovení žlučových kyselin ve vzorcích žluči myší

Stanovení žlučových kyselin ve vzorcích žluči myší proběhlo podle výše optimalizované metody. Identifikace žlučových kyselin proběhla na základě porovnání retenčních časů s retenčními časy proměřených standardů jednotlivých žlučových kyselin. Obr. 4.10 zobrazuje příklad HPLC-FLD chromatogramu analýzy vzorku „CDME treated žluč“, v němž byly identifikovány glykocholová, α -muricholová kyselina, glykochenodeoxycholová, glykodeoxycholová a cholová kyselina. Další tři studované žlučové kyseliny (λ -muricholová kyselina, deoxycholová kyselina a chenodeoxycholová kyselina) nebyly detegovány. Z chromatogramu je patrné, že vzorek obsahuje řadu nečistot, produktů derivatizační reakce a samotného nadbytku derivatizačního činidla. Dalším vhodným postupem by byla SPE předúprava vzorku žluči, která byla otestována, ale hlavně z časových důvodů, tj. omezeného času na diplomovou práci, nebyla dále rozpracována.



Obr. 4.10 HPLC-FLD chromatogram stanovení žlučových kyselin po jejich derivatizaci 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonátem: (1) vzorek „CDME treated žluč“, (2) směs standardů žlučových kyselin (každá o koncentraci 4×10^{-5} mol dm $^{-3}$). Identifikace píků: GCA glykocholová kyselina (t_r = 25,10 min), AMCA α -muricholová kyselina (t_r = 33,30 min), GCDCA glykochenodeoxycholová kyselina (t_r = 34,00 min), GDCA glykodeoxycholová kyselina (t_r = 35,90 min), LMCA λ -muricholová kyselina (t_r = 37,80 min), CA cholová kyselina (t_r = 40,10 min), CDCA chenodeoxycholová kyselina (t_r = 50,00 min), DCA deoxycholová kyselina (t_r = 50,80 min). Podmínky separace: kolona Supercosil LC-18 (250×4,6 mm; 5 μ m) chráněná předkolonkou Superguard LC-18 (2 cm), binární gradient (složka A acetonitril, B směs roztoku mravenčanu amonného o koncentraci 40 mmol dm $^{-3}$ (pH = 3,56):acetonitril (50:50, v/v), gradientový program 6 z tab. 4.1), průtok mobilní fáze 1,0 ml min $^{-1}$, teplota kolony 30 °C, fluorescenční detektor λ_{ex} = 333 nm, λ_{em} = 390 nm.

HPLC-FLD stanovení žlučových kyselin v analyzovaných vzorcích myší žluči proběhlo metodou lineární kalibrační závislosti. Vzhledem k tomu, že každý vzorek měl jiné množství, bylo ředění pro každý vzorek individuální. Pro zohlednění ztrát během přípravy biologického materiálu byla jako interní standard použita chenodeoxycholová kyselina, která se nenacházela v žádném vzorku studované myší žluči. Pomocí interního standardu byla zjištěna výtěžnost celkové předúpravy vzorku jako $74,8 \pm 1,9 \%$. Výsledky stanovení žlučových kyselin ve studovaných vzorcích jsou uvedeny v tab. 4.7.

Tabulka 4.7

Stanovené koncentrace žlučových kyselin v analyzovaných vzorcích myší žluči po jejich derivatizaci 1,2-benzo-3,4-dihydrokarbazol-9-ethyl-*p*-toluensulfonátem. Podmínky separace: kolona Supercosil LC-18 (250×4,6 mm; 5 μ m) chráněná předkolonkou Superguard LC-18 (2 cm), binární gradient (složka A acetonitril, B směs roztoku mravenčanu amonného o koncentraci 40 mmol dm⁻³ (pH = 3,56):acetonitril (50:50, v/v), gradientový program 6 z tab. 4.1), průtok mobilní fáze 1,0 ml min⁻¹, teplota kolony 30 °C, fluorescenční detektor $\lambda_{\text{ex}} = 333$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 390$ nm.

žlučová kyselina	c / μ mol dm ⁻³	
	„CDME treated žluč“	„untreated žluč“
glykocholová	47,14	128,52
α -muricholová	17,14	5,71
glykochenodeoxycholová	24,52	3,49
glykodeoxycholová	22,43	3,88
λ -muricholová	< LOD	< LOD
cholová	46,21	2,27
chenodeoxycholová	< LOD	< LOD
deoxycholová	< LOD	< LOD

Při porovnání stanovených koncentrací žlučových kyselin u vzorků „CDME treated žluč“ a „untreated žluč“ myší, je patrné, že u α -muricholové kyseliny, glykochenodeoxycholové kyseliny, glykodeoxycholové kyseliny a u cholové kyseliny došlo k vzrůstu koncentrace těchto žlučových kyselin ve žluči myší, které byly podrobeny dietě bohaté na dimethylester-L-cystinu. Naopak u glykocholové kyseliny došlo k poklesu její koncentrace. Ve všech případech se jednalo o změnu jednoho řádu.

Stanovené koncentrace žlučových kyselin v obou typech studovaných vzorků byly porovnány s běžnými hodnotami koncentrací žlučových kyselin ve žluči myší v tab. 2.3 (str. 20). U vzorku „CDME treated žluč“ se od běžného profilu žlučových kyselin (pro 8 týdnů staré myši) výrazněji odchyľují glykocholová a glykochenodeoxycholová kyselina. Na druhé straně je třeba upozornit, že u biologických vzorků běžně dochází

k velkému rozptylu kvantitativního zastoupení žlučových kyselin ve žluči. To může být způsobeno i stářím (12 týdnů stará myš oproti hodnotám v tab. 2.3, které jsou pro 8 týdnů staré myši) a druhem myší, způsobem vzorkování (doba celkového vzorkování, četnost odběrů) a uchovávání vzorku.

Cílem diplomové práce bylo vyvinout a optimalizovat HPLC metodu s fluorescenční detekcí pro stanovení žlučových kyselin ve žluči myší po jejich derivatizaci vhodným fluorescenčně aktivním činidlem. Bylo vybráno osm žlučových kyselin (cholová kyselina, glykocholová kyselina, deoxycholová kyselina, glykodeoxycholová kyselina, chenodeoxycholová kyselina, glykochenodeoxycholová kyselina, α -muricholová kyselina a λ -muricholová kyselina), pro které byla na základě literatury navržena a následně optimalizována HPLC metoda s fluorescenční detekcí pro jejich kvantifikaci v uvedeném biologickém materiálu. Pro všechny žlučové kyseliny byly změřeny kalibrační závislosti a stanoveny limity kvantifikace a limity detekce (v rozsahu 0,88–1,78 $\mu\text{mol dm}^{-3}$). V biologickém vzorku se vypracovanou metodou podařilo identifikovat a následně stanovit pět žlučových kyselin (cholová kyselina, glykocholová kyselina, glykodeoxycholová kyselina, glykochenodeoxycholová kyselina a α -muricholová kyselina).

Literatura

- [1] Hofmann A. F.; Hagey L. R.: Bile acids. Chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**:16, 2461–2483 (2008).
- [2] Haslewood G. A. D.: Bile salt evolution. *Journal of Lipid Research* **8**:6, 535–550 (1967).
- [3] Mukhopadhyay S.; Maitra U.: Chemistry and biology of bile acids. *Current Science* **87**:12, 1666–1683 (2004).
- [4] Monte M. J.; Marin J. J. G.; Antelo A.; Vazquez-Tato J.: Bile acids. Chemistry, physiology, and pathophysiology. *World Journal of Gastroenterology* **15**:7, 804–816 (2009).
- [5] Hofmann A. F.; Sjövall J.; Kurz G.; Radomska A.; Schteingart C. D.; Tint G. S.; Vlahcevic Z. R.; Setchell K. D. R.: A proposed nomenclature for bile acids. *Journal of Lipid Research* **33**:4, 599–604 (1992).
- [6] Jinmao Y.; Yunwei S.; Yongfei M.; Zhangyu Y.; Yanjun Y.; Jiayao L.: Development of a sensitive reagent, 1,2-benzo-3,4-dihydrocarbazole-9-ethyl-*p*-toluenesulfonate, for determination of bile acids in serum by HPLC with fluorescence detection, and identification by mass spectrometry with an APCI source. *Chromatographia* **60**:9, 527–535 (2004).
- [7] Armstrong M. J.; Carey M. C.: The hydrophobic-hydrophilic balance of bile salts. Inverse correlation between reverse-phase high performance liquid chromatographic mobilities and micellar cholesterol-solubilizing capacities. *Journal of Lipid Research* **23**:1, 70–80 (1982).
- [8] Thomas Ch.; Pellicciari R.; Pruzanski M.; Auwerx J.; Schoonjans K.: Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* **7**:8, 678–693 (2008).
- [9] Roda A.; Hofmann A. F.; Mysels K.: The influence of bile-salt structure on self association in aqueous solutions. *The Journal of Biological Chemistry* **258**:10, 6362–6370 (1983).
- [10] Hofmann A. F.; Mysels K. J.: Bile acid solubility and precipitation *in vitro* and *in vivo*: the role of conjugation, pH, and Ca^{2+} ions. *Journal of Lipid Research* **33**:5, 617–626 (1992).

- [11] Hofmann A. F.; Rods A.: Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: An overview of the problem. *Journal of Lipid Research* **25**:13, 1477–1489 (1984).
- [12] Björkhem I.: Mechanism of bile acid biosynthesis in mammalian liver. In: *Sterols and Bile Acids*. H. Danielsson, J. Sjövall (eds.). Elsevier 1985, p. 231–272.
- [13] Li T.; Chiang J. Y. L.: Bile acids signaling in liver metabolism and diseases and drug therapy. *Pharmacological Reviews* **66**:4, 948–983 (2014).
- [14] Virtanen E.; Kolehmainen E.: Use of bile acids in pharmacological and supramolecular applications. *European Journal of Organic Chemistry* **2004**:16, 3385–3399 (2004).
- [15] Woolbright B. L.; Li F.; Xie Y.; Farhood A.; Fickert P.; Trauner M.; Jaeschke H.: Lithocholic acid feeding results in directhepato-toxicity independent of neutrophil function in mice. *Toxicology Letters* **228**:1, 56–66 (2014).
- [16] Fickert P.; Zollner G.; Fuchsbichler A.; Stumptner C.; Pojer Ch.; Zenz R.; Lammert F.; Stieger B.; Meier J. P.; Zatloukal K.; Denk H.; Trauner M.: Effects of ursodeoxycholic and cholic acids feeding on hepatocellular transporter expression in mouse liver. *Gastroenterology* **121**:1, 170–183 (2001).
- [17] <http://www.drugbank.ca/drugs> (cit. 23. 4. 2017).
- [18] <http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty> (cit. 23. 4. 2017).
- [19] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound> (cit. 23. 4. 2017).
- [20] <https://chemicalize.com>, výmena za rondea (cit. 23. 4. 2017).
- [21] *The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Whitehouse Station, Merck 1996.
- [22] <http://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html> (cit. 4. 4. 2017).
- [23] Alnouti Y.; Csanaky I. L.; Klaassen D. K.: Quantitative-profiling of bile acids and their conjugates in mouse liver, bile, plasma, and urine using LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B* **873**:2, 209–217 (2008).
- [24] Russell D. W.: The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annual Review of Biochemistry* **72**:1, 137–174 (2003).
- [25] Lednicer D.: *Steroid Chemistry at a Glance*. Wiley 2011.
- [26] Gu J. J.; Hofmann A. F.; Ton-Nu H. T.; Schteingart C. D.; Mysels K. J.: Solubility of calcium salts of unconjugated and conjugated natural bile acids. *Journal of Lipid Research* **33**:5, 635–646 (1992).
- [27] Zhou H.; Hylemon P. B.: Bile acids are nutrient signaling hormones. *Steroids* **86**:8, 62–68 (2014).

- [28] Fu Z. D.; Cui Y. J.; Klaassen C. D.: Atorvastatin induces bile acid-synthetic enzyme Cyp7a1 by suppressing FXR signaling in both liver and intestine in mice. *Journal of Lipid Research* **55**:12, 2576–2586 (2014).
- [29] Stamp D.; Jenkins G.: *An overview of bile-acid synthesis, chemistry and function*. In: *Issues in Toxicology*. Cambridge, Royal Society of Chemistry 2008.
- [30] King M. W.: Bile Acid Synthesis, Metabolism and Biological Functions. Dostupné na <http://themedicalbiochemistrypage.org/bileacids.php> (cit. 23. 4. 2017).
- [31] Vaz F. M.; Ferdinandusse S.: Bile acid analysis in human disorders of bile acid biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, v tisku. DOI: 10.1016/j.mam.2017.03.003
- [32] Zhang Y.; Hong J.; Rockwell Ch. E.; Copple B. L.; Jaeschke H.; Klaassen C. D.: Effect of bile duct ligation on bile acid composition in mouse serum and liver. *Liver International* **32**:1, 58–69 (2011).
- [33] Wu Y.; Wang X.; Wu Q.; Wu X.; Lin X.; Xie Z.: Separation and determination of structurally related free bile acids by pressurized capillary electrochromatography coupled to laser induced fluorescence detection. *Analytical Methods* **2**:12, 1927–1933 (2010).
- [34] Compton R. G.; Foord J. S.; Marken F.: Electroanalysis at diamond-like and doped-diamond electrodes. *Electroanalysis* **15**:17, 1349–1363 (2003).
- [35] Hupert M.; Muck A.; Wang J.; Stotter J.; Cvačková Z.; Haymond S.; Show Y.; Swain G. M.: Conductive diamond thin-films in electrochemistry. *Diamond Related Material* **12**:10–11, 1940–1949 (2003).
- [36] Barek J.; Fischer J.; Navrátil T.; Pecková K.; Yosypchuk B.; Zima J.: Nontraditional electrode materials in environmental analysis of biologically active organic compounds. *Electroanalysis* **19**:19–20, 2003–2014 (2007).
- [37] Klouda J., Barek J., Nesměrák K., Schwarzová-Pecková K.: Non-enzymatic electrochemistry in characterization and analysis of steroid compounds. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v tisku DOI: 10.1080/10408347.2017.1318694
- [38] Ferri T.; Campanella L.; De Andelis G.: Differential-pulse polarographic determination of cholic acids. *Analyst* **109**:7, 923–925 (1984).
- [39] Liu X.; Wang L.; Zhang S.; Deng X.; Tang X.; Huangb X.: Electrochemical behavior of deoxycholic acid on multiwalled carbon nanotubes modified electrode. *Electroanalysis* **18**:23, 2385–2388 (2006).
- [40] Medici A.; Pedrini P.; de Battisti A.; Fantin G.; Fogagnolo M.; Guerrini A.: Anodic electrochemical oxidation of cholic acid. *Steroids* **66**:2, 63–69 (2001).

- [41] Bonfatti F.; de Battisti A.; Ferro S.; Medici A.; Pedrini P.: Electrosynthesis of dehydrocholic acid from cholic acid. *Journal of Applied Electrochemistry* **30**:8, 995–998 (2000).
- [42] Scalia S.: Bile acid separation. *Journal of Chromatography* **671**:1–2, 299–317 (1995).
- [43] Griffiths W. J.; Sjövall J.: Bile acids: Analysis in biological fluids and tissues. *Journal of Lipid Research* **51**:1, 23–41 (2010).
- [44] Gatti R.; Roda A.; Cerre C.; Bonazzi D.; Cavrini V.: HPLC-fluorescence determination of individual free and conjugated bile acids in human serum. *Biomedical Chromatography* **11**:1, 11–15, (1997).
- [45] Kurosawa T.; Sato H.; Sato M.; Takechi H.; Machida M.; Tohma M.: Analysis of stereoisomeric C27-bile acids by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **15**:9–10, 1375–1382 (1997).
- [46] Hirano Y.; Miyazaki H.; Higashidate S.; Nakayama F.: Analysis of 3-sulfated and nonsulfated bile acids by one-step solvolysis and high performance liquid chromatography. *Journal Lipid Research* **28**:12, 1524–1529 (1987).
- [47] Ye L.; Liu S.; Wang M.; Shao Y.; Ding M.: High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of bile acid profiles in serum of women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Journal of Chromatography B Biomedical Applications* **860**:1, 10–17 (2007).
- [48] Huang J.; Bathena R. P. S.; Csanaky L. I.; Alnouti Y.: Simultaneous characterization of bile acids and their sulfate metabolites in mouse liver, plasma, bile and urine using LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **55**:5, 1111–1119 (2011).
- [49] Mi S.; Lim W. D.; Turner M. J.; Wales P. W.; Curtis J. M.: Determination of bile acids on piglet bile by solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Lipids* **51**:3, 359–372 (2016).
- [50] Scalia S.; Salvatore Tirendi S.; Paolo Pazzi P.; Ennio Bousquet E.: Assay of free bile acids in pharmaceutical preparations by HPLC with electrochemical detection. *International Journal of Pharmaceutics* **115**:2, 249–253 (1995).
- [51] Araki Y.; Mukaisyo K.; Sugihara H.; Fujiyama Y.; Hattori T.: Detection of N-nitroso-bile acids at 285 nm in reverse-phase HPLC. *Journal of Separation Science* **31**:15, 2827–2830 (2008).

- [52] Kakiyama G.; Muto A.; Takei H.; Nittono H.; Murai T.; Kurosawa T.; Hofmann A. F.; Pandak W. M.; Bajaj J. S.: Development of a simple and accurate HPLC method for measurement of fecal bile acids: validation by GC-MS and LC-MS and application in health and cirrhotic patients. *Journal Lipid Research* **55**:5, 978–990 (2014).
- [53] Chaplin M. F.: Analysis of bile acids and their conjugates using high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography B* **664**:2, 431–434 (1995).
- [54] Kobayashi N.; Oiwa H.; Goto J.: Production and characterization of group-specific monoclonal antibodies recognizing nonamidated, glycine- and taurine- amidated ursodeoxycholic acid 7-N-acetylglucosaminides. *Journal Steroid Biochemistry Molecular Biology* **64**:3–4, 171–177 (1998).
- [55] Bartling B.; Li L.; Liu C. C.: Determination of total bile acid levels using a thick-film screen-printed Ir/C sensor for the detection of liver disease. *Analyst* **134**:5, 973–979 (2009).
- [56] Ehtmann J.; Hůlek P. a kol.: *Hepatologie*. Vyd. 2. Praha, Grada Publishing 2014.
- [57] Sahota A.; Parihar J.S.; Capaccione K.M.; Yang M.; Noll K.; Gordon D.; Reimer D.; Yang I.; Buckley B.T.; Polunas M.; Reuhl K.R.; Lewis M.R.; Ward M.D.; Goldfarb D.S.; Tischfield J.A. : Novel cystine ester mimics for the treatment of cystinuria-induced urolithiasis in a knockout mouse model. *Basic and Translation Science, Urology* **84**:5, 1249.e9–1249.e15 (2014).
- [58] Miller J. N.; Miller J. C.: *Statistics and Chemometries for Analytical Chemistry*. 5th Edition. Harlow, Pearson Education 2005.
- [59] Snyder L. R.; Kirkland J. J.; Dolan J. Y.: *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 3rd Edition. New Jersey, Wiley 2010.